

Vergleichende Permeabilitäts- und Penetrationsstudien in vitro an Schweinekornea und Rindernasenmukosa sowie biophysikalische Untersuchungen an potentiellen Formulierungen (Mikroemulsionen)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Telse Erika Richter

geboren am 06.07.1971

in Karlsruhe

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter/innen:

1. Frau Prof. Dr. Sigrid Keipert
2. Herr Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert
3. Herr Prof. Dr. Dietmar Möbius

Tag der mündlichen Prüfung: 05. April 2004

*Wer des Lichts begehrt, muss ins Dunkel gehn.
Was das Grauen mehrt, lässt das Heil erstehn.
Wo kein Sinn mehr misst, waltet erst der Sinn.
Wo kein Weg mehr ist, ist des Wegs Beginn.
(Manfred Hausmann)*

DANKSAGUNG

Meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Sigrid Keipert danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die zahlreichen interessanten Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Möbius am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Messungen am Langmuir-Trog und die fruchtbaren Diskussionen der erlangten Ergebnisse meinen Dank aussprechen. Für die technische Unterstützung bei den Experimenten danke ich herzlich Herrn Werner Zeiss.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Kaercher, Augenklinik Ludwigshafen für die problemlose Bereitstellung der MGS-Proben.

Für die Möglichkeit zur Durchführung der SAXS-Untersuchungen möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Antonietti am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Golm, danken.

Frau Ilse Fleischer danke ich für die Durchführung der DSC-Messungen sowie für weitere Bestimmungen physikalisch-chemischer Kenngrößen der Mikroemulsionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert und seiner Arbeitsgruppe, vor allem Herrn Dr. Holger Brosig und Herrn Dr. Ingo Siebenbrodt, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in der Endphase der Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Bettina Bert, die mir durch ihre fachliche Unterstützung bei der Kaninchenbetreuung ebenso wie bei der statistischen Auswertung meiner Daten eine große Hilfe war.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Bruder Boyke bedanken für die große Geduld und wertvolle Hilfe bei den zahlreichen computertechnischen Problemen, sowie bei meiner Familie ebenso wie bei meinen Freunden für jegliche Unterstützung während der Promotionszeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	9
2	PROBLEMSTELLUNG	11
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	12
3.1	Anatomie und Physiologie des Auges	12
3.1.1	<i>Kornea</i>	13
3.1.2	<i>Tränenfilm</i>	14
3.1.3	<i>Enzyme</i>	16
3.2	Anatomie und Physiologie der Nase	16
3.2.1	<i>Nasenmukosa</i>	17
3.2.2	<i>Enzyme</i>	19
3.3	Auge und Nase als Applikationsorgane für Arzneistoffe	19
3.4	Verwendete Wirkstoffe	24
3.4.1	<i>Androstendion und Testosteron</i>	24
3.4.2	<i>Fluorescein</i>	25
3.5	Verwendete Hilfsstoffe	26
3.5.1	<i>Cremophor®EL</i>	26
3.5.2	<i>Propylenglykol</i>	27
3.5.3	<i>Isopropylmyristat</i>	27
3.5.4	<i>Cyclodextrine</i>	27
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	30
4.1	Mikroemulsionssysteme	30
4.1.1	<i>Allgemeines</i>	30
4.1.2	<i>Zusammensetzung</i>	31
4.1.3	<i>Charakterisierung</i>	34
4.1.3.1	Theoretischer Hintergrund	34
4.1.3.2	Physikalisch-chemische Parameter	36
4.1.3.3	DSC-Messungen	38
4.1.3.4	Röntgenkleinwinkelstreuung	41
4.1.4	<i>Arzneistoff-Wechselwirkungen</i>	43
4.1.4.1	Verteilungskoeffizient.....	43
4.1.4.2	Sättigungslöslichkeit	45
4.1.4.3	Cyclodextrin-Einschluss des AD	47
4.2	Permeationsstudien	50
4.2.1	<i>Einführung</i>	50

4.2.2	<i>Theoretischer Hintergrund</i>	52
4.2.3	<i>Ergebnisse</i>	53
4.2.3.1	Androstendion	53
4.2.3.2	Testosteron	66
4.2.3.3	Fluorescein-Na	67
4.3	Penetrationsstudien	73
4.3.1	<i>Einführung</i>	73
4.3.2	<i>Rindernasemukosa</i>	74
4.3.3	<i>Schweinekornea-Epithel</i>	76
4.4	In-vivo-Studien	81
4.5	Biophysikalische Untersuchungen	85
4.5.1	<i>Theoretische Grundlagen</i>	85
4.5.2	<i>Ergebnisse</i>	88
4.5.2.1	Spreitung von MGS auf Wasser/Puffer	88
4.5.2.2	Subphasen-Zusatz: Cremophor®EL	90
4.5.2.3	Subphasen-Zusatz: Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin	93
4.5.2.4	Subphasen-Zusatz: Hydroxytrimethylammoniopropyl- β -Cyclodextrin	95
4.5.2.5	Subphasen-Zusatz: Propylenglykol	96
4.5.2.6	Subphasen-Zusatz: Mikroemulsion ME-CD	97
4.5.2.7	Subphasen-Zusatz: Mikroemulsionen ME-PG bzw. ME-ION	102
4.5.2.8	Subphasen-Zusatz: Mischungen aus CrEL mit HP- γ -CD bzw. HTAP-...	103
4.5.2.9	Subphasen-Zusatz: Fertigarzneimittel liposic®	104
5	EXPERIMENTELLER TEIL	108
5.1	Substanzen	108
5.2	Methoden	110
5.2.1	<i>Gehaltsbestimmungen</i>	110
5.2.1.1	Androstendion und Testosteron	110
5.2.1.2	Fluorescein	110
5.2.2	<i>Herstellung der Mikroemulsionen</i>	111
5.2.3	<i>Färbemethode</i>	111
5.2.4	<i>Polarisationsmikroskopie</i>	111
5.2.5	<i>Physikalisch-chemische Untersuchungen</i>	112
5.2.5.1	Viskosität	112
5.2.5.2	Dichte	112
5.2.5.3	pH-Wert	112
5.2.5.4	Brechungsindex	112
5.2.5.5	Tonizität	112
5.2.5.6	Oberflächenspannung	113

5.2.5.7	Dielektrizitätskonstante	113
5.2.6	Kalorimetrische Messungen	113
5.2.7	Röntgenkleinwinkelstreuung	114
5.2.8	Verteilungskoeffizient	114
5.2.9	Sättigungslöslichkeit	115
5.2.10	In-vitro-Permeationsstudien	115
5.2.10.1	Präparieren des Gewebes	118
5.2.10.2	Synthetische Membran	119
5.2.11	Penetrations- und Metabolisierungs-Studien	119
5.2.11.1	Rindernasenschleimhaut	119
5.2.11.2	Schweinekornea	120
5.2.12	In-vivo-Studien	121
5.2.13	Biophysikalische Untersuchungen	122
5.2.14	Statistik	125
6	ZUSAMMENFASSUNG	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
AD	Androstendion
AUC	Integral des zeitlichen Plasmaspiegelverlaufs (<i>area under the curve</i>)
BAM	Brewster-Winkel Mikroskop (<i>Brewster angle microscope</i>)
CD	Cyclodextrin
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CrEL	Cremophor [®] EL
DSC	Wärmestrom-Differenz-Kalorimetrie (<i>differential scanning calorimetry</i>)
FSC	Fluorescein-Na
GIT	Gastro-Intestinal-Trakt
GM	Grundmischung (der ME)
HP- γ -CD	Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin
HTAP- β -CD	Hydroxytrimethylammoniopropyl- β -Cyclodextrin
IPM	Isopropylmyristat
K _{stab}	Apparente Komplexstabilitätskonstante
ME	Mikroemulsion
ME-CD	ME mit HP- γ -CD als Kotensid
ME-ION	ME mit HTAP- β -CD als Kotensid
ME-PG	ME mit PG als Kotensid
MGS	Meibom'sches Drüsensekret (<i>meibomian gland secretion</i>)
MTBE	Methyl-tert. Butylether
PG	Propylenglykol
P _{eff}	Effektiver Permeationskoeffizient [cm/s]
RT	Raumtemperatur (15 - 25 °C, [1])

SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>small angle X-ray scattering</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
TST	Testosteron
VK	Verteilungskoeffizient
	VK _{okt} : VK zwischen Oktanol und Wasser
	VK _{ipm} : VK zwischen IPM und Wasser

1 EINLEITUNG

Die Nasenschleimhaut (Mukosa) und die Hornhaut des Auges (Kornea) stellen in ihrem morphologischen Aufbau zwei differente biologische Membranen dar. Beide besitzen sie aber die Funktion, ein Sinnesorgan gegen schädigende Einflüsse von außen zu schützen, da in beiden Fällen ein direkter Kontakt zur externen Umgebung besteht.

Die Hornhaut bietet mechanischen Widerstand durch ihren dicken, mehrschichtigen Aufbau bei gleichzeitiger Transparenz, so dass Lichtreflexe von der Netzhaut des Auges aufgenommen werden können. Wichtige Schutzfunktionen üben weiterhin der Tränenfilm, der die Hornhaut bzw. die gesamte äußere Augenoberfläche überzieht und bei Bedarf in deutlich gesteigerter Menge produziert wird, sowie die Augenlider, die reflexartig geschlossen werden können, aus.

Aufgabe der Nasenschleimhaut ist es, die Atemluft zu reinigen, zu befeuchten und anzuwärmen sowie schädigende Substanzen herauszufiltern. Bestimmte Regionen dienen zur Aufnahme von Duftstoffen. Der kontinuierlich abfließende Nasenschleim, der von der Mukosa gebildet wird, sowie eine bemerkenswert hohe Enzym-Konzentration in der Mukosa bzw. im Nasenschleim dienen dem Schutz der Nase sowie des Gesamtorganismus.

Aufgrund der Lokalisierung von Auge und Nase an der Körperoberfläche und einem direkten Kontakt der Membranen, Kornea bzw. Mukosa, zur Außenwelt, sind diese einerseits trotz der vorhandenen Schutzfunktionen eine bevorzugte Angriffsfläche für Krankheitserreger, andererseits aber auch im lokalen Krankheitsfall unkompliziert zu therapieren. Da eine einfache und schmerzlose Applikation von Arzneistoffen generell eine wünschenswerte Eigenschaft für jedes Medikament ist, insbesondere bei Mehrfachanwendung oder Dauertherapie, werden beide Membranen darüber hinaus als Applikationsorte zur Verabreichung systemisch wirkender Substanzen immer wieder in Erwägung gezogen [2 - 5] bzw. bereits genutzt (z.B. Calcitonin/ Karil® Nasenspray, Sumatriptan/ Imigran® nasal).

Allerdings ist die systemische Verfügbarkeit okular oder nasal applizierter Wirkstoffe nicht unproblematisch, da die Kornea im Vergleich zu anderen Membranen eine sehr schlechte Permeabilität für eine Vielzahl von Substanzen aufweist, und die Nasenmukosa aufgrund ihrer hohen enzymatischen Aktivität viele Wirkstoffe vor bzw. während der Absorption inaktiviert. Durch Variierung der Formulierungsparameter oder durch Einsatz spezifischer Trägersysteme wird deshalb versucht, die Bioverfügbarkeit nach okularer oder nasaler Verabreichung zu erhöhen. Der galenisch-technologischen Entwicklung modifizierter Systeme sind jedoch deutliche Grenzen gesetzt, da beide Organe sensibel reagieren und in

ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden dürfen. So ist bei okularen Zubereitungen besonders auf Reizfreiheit und eine möglichst geringe Beeinträchtigung der Sicht zu achten. Nasalia sollten eine gute Verträglichkeit hinsichtlich der Zilienfunktion und nach Möglichkeit eine gute Sprühbarkeit zwecks Verabreichung als Dosierspray aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit, die systemische Verfügbarkeit eines Arzneistoffs zu verbessern, stellt die Erhöhung seiner Löslichkeit dar. Da dies zumeist lipophile Wirkstoffe betrifft, ist ein deutlicher Anstieg der gelösten Menge primär durch ein ebenfalls lipophiles Trägermedium zu erreichen, was jedoch Nachteile, wie eine verzögerte Arzneistofffreigabe oder ein unangenehmes Empfinden beim Patienten, mit sich bringt. Darüber hinaus gelangen häufig Zusatzstoffe zum Einsatz, die die Permeabilität der Membran erhöhen sollen und als Enhancer bezeichnet werden [6 - 8]. Bei Verwendung dieser Substanzen ist zu beachten, dass ihr Einfluss auf die Membran reversibel sein muss und die physiologischen Abläufe nicht beeinträchtigt werden dürfen.

Für eine Vielzahl an Arzneistoffen besteht also hohes Interesse an innovativen Trägersystemen, durch die eine systemische Verfügbarkeit nach nasaler oder okularer Darreichung ermöglicht wird. Ein Vergleich der Permeabilitäten der beiden Membranen Kornea und Mukosa ist aufgrund ihrer engen anatomischen und physiologischen Verknüpfung zur Einschätzung von Wirkungen und Nebenwirkungen applizierter Substanzen sowie für eine ggf. beiderseitige Nutzbarkeit der Trägerformulierungen von Interesse.

2 PROBLEMSTELLUNG

In dieser Arbeit sollten die beiden Membranen Kornea und Mukosa hinsichtlich ihrer Permeabilität für den lipophilen Arzneistoff Androstendion (AD) verglichen werden. Für AD, das sowohl zur ophthalmologischen Anwendung [9, 10] als auch für die nasale Applikation mit systemischer Wirkung von Interesse ist [11], lagen bereits Untersuchungen in der Arbeitsgruppe vor [74], die als Basis dienten. Zur Durchführung dieser vergleichenden In-vitro-Studien war ein Permeationsmodell erforderlich, das das Fixieren sowohl der dünnen, planen Nasenschleimhaut als auch der relativ dicken, konkaven Kornea sowie das Arbeiten unter identischen Versuchsbedingungen gestattete. Es konnte von einem für die Kornea etablierten Modell [12] ausgegangen werden.

Neben der gepufferten Arzneistofflösung sollten zwei entwickelte wasserkontinuierliche, nicht-ionische Mikroemulsionen (ME) und ihre Einzelkomponenten als Trägerformulierungen bei den Permeationsstudien im Vordergrund stehen. Dazu war die physikalisch-chemische Charakterisierung dieser Systeme Voraussetzung. Darüber hinaus war ein ME-System mit einem kationischen K tensid zu entwickeln, zu charakterisieren und in die Untersuchungen einzubeziehen. Um auch den „hydrophilen Permeationsweg“ zu testen, sollte parallel Fluorescein-Na (FSC) als hydrophile Modellsubstanz einbezogen werden.

Da beide Membranen aufgrund ihres differenzierten Aufbaus ein unterschiedliches Verteilungsverhalten des lipophilen AD zwischen Donatorlösung und Membran erwarten ließen und darüber hinaus eine beachtliche enzymatische Barriere darstellen [13, 14], sollten in einem weiteren Versuchsblock die Penetrationsrate und parallel dazu der metabolische Abbau, den AD während des Membrandurchtritts erfahren kann, untersucht werden. Bei diesen Experimenten waren der Einfluss der ME und ihrer Bestandteile auf das Verteilungsverhalten sowie auf eine Metabolisierung von besonderem Interesse.

Zur Charakterisierung der systemischen Verfügbarkeit von AD nach nasaler Applikation waren im Anschluss an die Permeations- und Penetrationsversuche In-vivo-Studien an Kaninchen durchzuführen.

Um schließlich die Verhältnisse am Auge bzw. den mehrschichtigen Tränenfilm hinsichtlich einer Applikation der ME-Systeme modellhaft zu simulieren, sollten biophysikalische Untersuchungen in einem Langmuir-Trog mit Meibom'schen Drüsensekret als Oberflächenfilm durchgeführt werden, die über mögliche Interaktionen der Formulierungen bzw. ihrer Bestandteile mit der Tränenlipidschicht des Auges Auskunft geben sollten.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Anatomie und Physiologie des Auges

Die umgebende Hülle des menschlichen Augapfels gliedert sich in drei Schichten: die äußere, mittlere und innere Augenhaut. Abb. 1 zeigt einen Querschnitt durch das menschliche Auge.

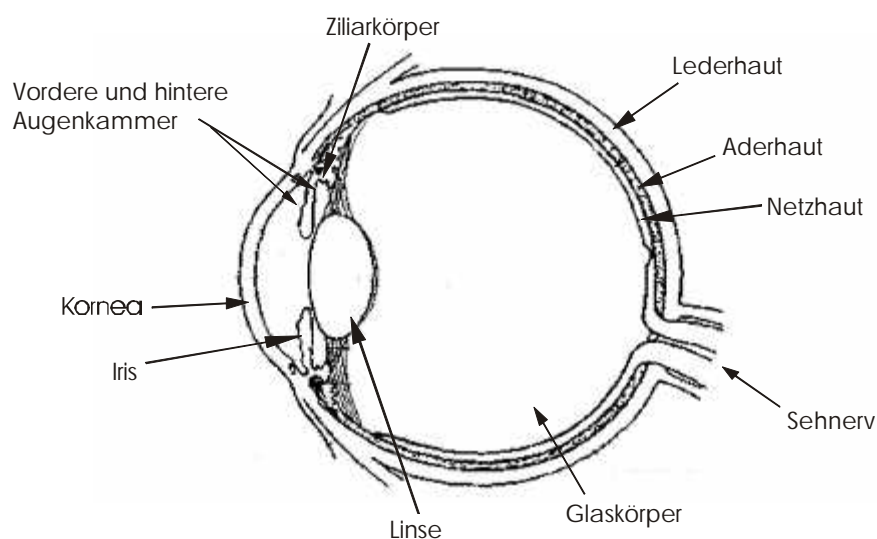


Abb. 1: Anatomie des menschlichen Auges; nach [26]

Die äußere Augenhaut (*Tunica externa*) wird von der **Lederhaut** (*Sklera*) und **Hornhaut** (*Kornea*) gebildet, wobei die Kornea einen stärkeren Krümmungsradius aufweist und wie ein Uhrglas in die Sklera eingelassen ist. Die mittlere Augenhaut besteht aus der **Aderhaut** (*Chorioidea*), die im vorderen Abschnitt des Auges in den **Ziliarkörper** (*Corpus ciliare*) und die **Regenbogenhaut** (*Iris*), die das Sehloch (*Pupille*) umringt, übergeht. Der innere Teil der Augenhülle wird schließlich von der **Netzhaut** (*Retina*) und den Sinneszellen gebildet. Im Augeninneren befindet sich direkt hinter der Iris die **Linse**, die über die Zonulafasern am Ziliarkörper aufgehängt ist. Die Linse ist gefäß- und nervenfrei und kann ihre Form durch Einwirken der Zonulafasern ändern, verursacht durch Kontraktion bzw. Erschlaffen des Ziliarmuskels, wodurch Nah- und Fernakkommodation bewerkstelligt werden.

Der hintere Teil des Augapfels ist mit dem gelartigen **Glaskörper** gefüllt, der zu 98 – 99% aus Wasser besteht, das an Proteoglykane gebunden ist. Zwischen Kornea und Iris bzw.

zwischen Iris und Linse liegen die **vordere** und **hintere Augenkammer**, die mit dem Kammerwasser gefüllt sind. Das Kammerwasser wird über das Epithel des Ziliarkörpers in die hintere Augenkammer abgesondert, fließt durch die Pupille in die vordere Augenkammer und von dort über die sogenannten Fontana'schen Räume in den ringförmigen Schlemm'schen Kanal, der sich am Übergang von Kornea zu Sklera im Kammerwinkel befindet und mit dem Venensystem des Auges in Verbindung steht.

3.1.1 KORNEA

Da in dieser Arbeit verschiedene Untersuchungen zur okularen Verfügbarkeit von Wirkstoffen anhand von kornealem Gewebe durchgeführt wurden, wird auf diese Membran gesondert eingegangen. Die Kornea ist mehrschichtig aufgebaut, in ihrer Gesamtheit aber gefäßfrei und durchsichtig. In Abb. 2 ist ein schematisierter Querschnitt durch die Kornea gezeigt.

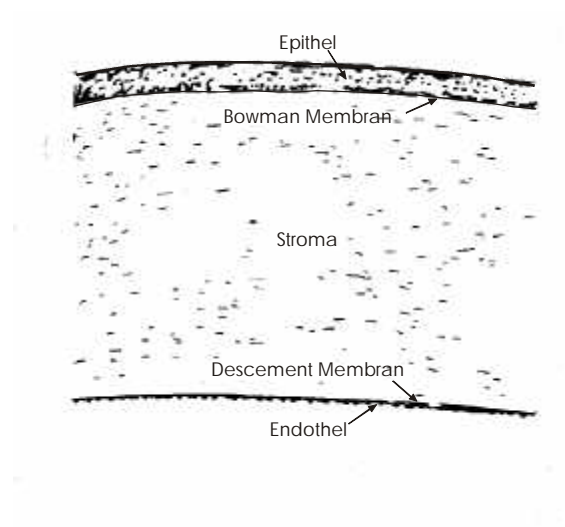


Abb. 2: Schematischer Querschnitt durch die Kornea; nach [15]

Die äußere Schicht stellt das lipophile **Epithel** dar, das im Vergleich zu anderen Epithelien, mit Ausnahme des Stratum corneum der Haut, relativ impermeabel ist [16] und eine Dicke von ca. 50 µm aufweist. Darunter liegt die **Bowman-Membran**, ein Monolayer zwischen Epithel und Stroma. Der dominierende Teil der Kornea ist mit 90% das hydrophile **Stroma**. Es weist eine Dicke von 400-450 µm auf und besteht größtenteils aus Wasser in lamellenartig angeordneten Kollagenfibrillen. In Richtung vorderer Augenkammer folgen die **Descement-Membran** sowie das **Endothel**, beides einzellige Schichten. Das lipophile Endothel

stellt eine eher schwache Barriere dar, die den Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen Kammerwasser und Kornea ermöglicht und damit unter anderem die Versorgung der gefäßfreien Hornhaut gewährleistet.

Zwei weit verbreitete Augenerkrankungen sind der Graue und der Grüne Star. Der Graue Star (Katarakt) bezeichnet eine durch Oxidationsprozesse verursachte Linsentrübung, die häufig einen Alterungsprozess darstellt. Man spricht in diesem Fall auch vom Altersstar. Der Grüne Star (Glaukom) entsteht durch ein Missverhältnis von Bildung und Abfluss des Kammerwassers und einem damit verbundenen pathologischen Anstieg des Augeninnendrucks. Für ein ungehindertes Abfließen ist eine Weitstellung des Kammerwinkels erforderlich, die bei eng gestellter Pupille gewährleistet wird.

Eine Therapie dieser oder auch einer Vielzahl anderer Augenerkrankungen kann im günstigsten Fall durch topische Applikation eines geeigneten Wirkstoffs erfolgen. Arzneistoffe aus Augenarzneien gelangen zumeist durch Permeation der Kornea in das Augeninnere [17]. Eine Permeation weiterer Barrieren des Auges, insbesondere der Konjunktiva, kann aufgrund deren starker Durchblutung in höherem Maße zur systemischen Resorption des Wirkstoffs führen, so dass mit Nebenwirkungen an anderen Zielorganen gerechnet werden muss. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Permeabilitäten der Konjunktiva und der Sklera aufgrund ihres im Vergleich zur Kornea einfacher strukturierten Aufbaus sowie ihrer größeren Porendurchmesser sowohl für lipophile als auch für hydrophile Substanzen deutlich höher liegen als für die Kornea [18 - 20], wovon jedoch die intra-okulare Arzneistoffkonzentration unbeeinflusst bleibt.

3.1.2 TRÄNENFILM

Der Tränenfilm trägt epithelseitig zur Ernährung der Kornea mit Elektrolyten und Flüssigkeit bei und ist darüber hinaus für die Reinigung und Befeuchtung der Korneaoberfläche verantwortlich. Erst durch den anhaftenden Tränenfilm erhält die Kornea ihre glatte, glänzende Oberfläche. Ein intakter Tränenfilm ist für die Funktionsabläufe am Auge eine wichtige Voraussetzung. Er überzieht alle äußeren Oberflächen des vorderen Augenabschnitts sowie die Konjunktiva und besteht selbst aus einer Vielzahl von Komponenten in unterschiedlichen Schichten.

Direkt auf dem **Kornea-Epithel** liegt die über **Mikrovilli** und **Glykokalix** verankerte **Muzinschicht** (Abb. 3). Entgegen früheren Vermutungen macht die Mukusschicht den Großteil des Tränenfilms aus und bildet eine gelartige, sehr stabile Struktur [21, 22]. Über dem Mukusgel liegt eine hydratisierende **wässrige Schicht**, auf deren Oberfläche eine **Lipidschicht** schwimmt. Die Lipidschicht ist ebenfalls sehr widerstandsfähig und hat vorwiegend die Aufgabe, ein Verdunsten des Wassers aus dem Tränenfilm und ein Eindringen von Hautsebum in das Auge zu verhindern [23].

Das Gesamtvolumen der Tränen beträgt ungefähr 7 μl , wovon 1 μl den präkornealen Tränenfilm bildet, 3 μl vor den Lidrändern aufstauen und der Rest im Bindehautsack verteilt ist [24], der in der Lage ist, ungefähr weitere 30 μl an Flüssigkeit aufzunehmen. Eine Durchmischung der einzelnen Komponenten findet so gut wie nicht statt [21], allerdings werden durch den in der Regel alle 5 s stattfindenden Lidschlag Sekretion, Spreitung und Abfluss der Tränenflüssigkeit gefördert. Die normale Tränenproduktion beträgt 1-2 $\mu\text{l}/\text{min}$ [25]. In Tabelle 1 sind einige physikalisch-chemische Kenngrößen des menschlichen Tränenfilms aufgeführt.



Abb. 3: Schematisierter Aufbau des Tränenfilms; nach [21]

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Parameter der Tränen

pH	7,1 – 7,5 [26]
Tonizität [mOsmol/kg]	286 – 304 [24]
Viskosität [mPa•s]	~ 2 [26]
Oberflächenspannung [mN/m]	43,6 – 46,6 [27]
Brechungsindex	1,336 – 1,357 [28]

Die Bildung der einzelnen Komponenten erfolgt in den Gobletzellen sowie konjunktivalen und kornealen Epithelzellen (Muzin), den Tränendrüsen im äußeren Augenwinkel (wässrige Tränenflüssigkeit) und den Meibom'schen Drüsen (Lipidschicht, vgl. Kap. 4.5.1).

Der Gesamtproteingehalt der Tränen beträgt 5 – 20 g/l und kann unterteilt werden in ein anodisches Albumin, eine kathodische Lysozymfraktion und eine Zwischenfraktion aus Lactoferrin und anderen Proteinen [13]. Die Proteine des Plasmas fehlen aufgrund der Blut-Tränen-Schranke.

3.1.3 ENZYME

Im Tränenfilm sowie in den unterschiedlichen Geweben des Auges befinden sich zahlreiche Enzyme. In der Tränenflüssigkeit tritt neben Lactoferrin, sekretorischem Immunglobulin A und Enzymen des Energiestoffwechsels das Lysozym in bemerkenswert hoher Konzentration auf [29] und verhindert als bakteriostatisches Enzym ein Eindringen von Bakterien in das Auge. In den verschiedenen Geweben des Auges finden sich Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels sowie lysosomale Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen, darunter zahlreiche Oxidoreduktasen, sowie Transferasen, Hydrolasen, Lyasen und Isomerasen [13]. Während das Kornea-Epithel, ebenso wie die Konjunktiva, verhältnismäßig hohe Enzymaktivitäten aufweist, liegen dagegen im Endothel beispielsweise die Werte der NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen bei wesentlich geringeren Aktivitäten. Das Stroma enthält aufgrund seiner Struktur und Polarität niedrigere Konzentrationen aller Enzyme. Die höchsten Aktivitäten hinsichtlich eines enzymatischen Substanzumsatzes zeigen der Iris-Ziliarkörper und die Iris, da diese intra-okularen Gewebe aufgrund einer verhältnismäßig guten Durchblutung bevorzugt mit Fremdsubstanzen aus dem Blut in Berührung kommen [30]. Bei Applikation eines Arzneistoffs ist dessen möglicher Abbau bzw. seine Inaktivierung durch entsprechende Enzyme während seiner Membranpassage zu bedenken.

3.2 Anatomie und Physiologie der Nase

Die Nase ist vertikal durch die Nasenscheidewand (*Septum nasi*) in zwei symmetrische Hälften geteilt und über die Nasenlöcher (*Nares*) zur äußeren Umgebung hin offen. Die beiden Nasenhälften bzw. Nasenhöhlen münden in den Rachenraum und sind über den Kehlkopf mit der Luftröhre verbunden. Jede Nasenhöhle kann in drei Teile untergliedert

werden: den Nasenvorhof (*Vestibulum nasi*), die Geruchszone (*Regio olfactoria*) und die Respirationszone (*Regio respiratoria*). Abb. 4 gibt einen Überblick über die anatomischen Verhältnisse der menschlichen Nase.

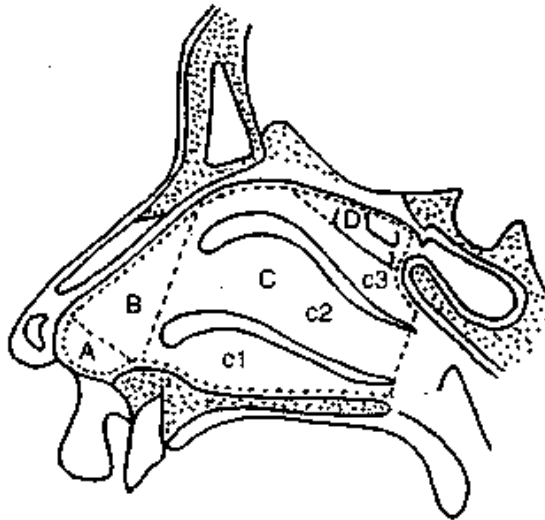


Abb. 4: Anatomie der menschlichen Nase: A = Nasenvorhof, B = Atrium, C = Respirationszone (c1-3 = Nasenmuscheln s.Text), D = Geruchszone; nach [32]

Der **Nasenvorhof (A)** beginnt an den Nasenlöchern und mündet an der Vorhofschwelle, auch inneres Nasenloch genannt, in das **Atrium (B)**. An dieser Stelle geht die äußere Haut allmählich in das mehrreihige Flimmerepithel der Nasenhöhle über. Mit einer Fläche von 150 - 200 cm² überzieht die **Respirationszone (C)** annähernd die gesamte Nasenhöhle, mit Ausnahme der **Geruchszone (D)**, die jeweils in der Kuppel einer Nasenhöhle lokalisiert ist, und stellt damit die hauptsächliche Absorptionsfläche für Arzneistoffe dar. Die Geruchszone nimmt beim Menschen mit 20 cm² eine verhältnismäßig kleine Fläche ein, was ein Vergleich mit dem Hund deutlich macht, bei dem die olfaktorische Region etwa 170 cm² misst [31].

Beide Nasenhöhlen bilden jeweils seitlich drei **Nasenmuscheln (c1 – 3)** (*Concha nasalis superior, media, inferior*), die aufgrund der Oberflächenerweiterung einen guten Kontakt der inhalierten Luft mit der Nasenschleimhaut gewährleisten.

3.2.1 NASENMUKOSA

Die Nasenschleimhaut belegt die Respirations- und Geruchszone und stellt ein mehrreihiges Flimmerepithel dar, bestehend aus verschiedenen Zelltypen, die apikal durch Tight-junctions verbunden sind. Das darunter anschließende Bindegewebe (*Lamina propria*) enthält ein

dichtes Netzwerk von Nerven und Blutgefäßen sowie serosale und mukosale Drüsen, die zur Epitheloberfläche hin sezernieren. Abb. 5 zeigt einen Querschnitt durch die Nasenschleimhaut der Respirationszone mit allen vorhandenen Zelltypen sowie mit der darüber liegenden Mukusschicht. Durch die **Basalmembran** wird das respiratorische Epithel vom darunter anschließenden Bindegewebe getrennt. Die Nasenmukosa besteht aus zilienlosen bzw. zilientragenden **Epithelzellen** sowie **Becherzellen** und **Basalzellen**.

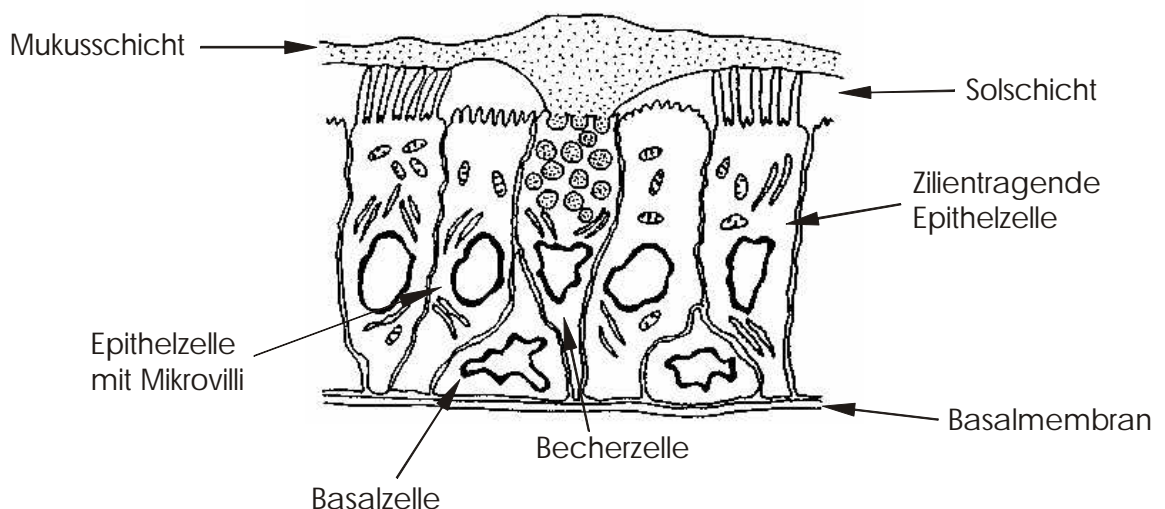


Abb. 5: Querschnitt durch die Nasenschleimhaut; nach [32]

Die Basalzellen erreichen selbst nie die Epitheloberfläche und weisen die Fähigkeit auf, in alle anderen Zelltypen zu differenzieren, weswegen sie auch als Ersatzzellen bezeichnet werden. Die Becherzellen sind zu ca. 5 – 15% vorhanden und produzieren zusammen mit den submukosalen Drüsen die etwa 5 – 11 μm dicke Mukusschicht. Zilienlose Epithelzellen repräsentieren ca. 70% des Epithels und besitzen an ihrer Oberfläche etwa 300 – 400 **Mikrovilli**. Weitere 20% des Epithels bestehen aus Zellen, deren Oberfläche ungefähr 200 Zilien aufweist, die mit einer Länge von 5 – 10 μm und einem Durchmesser von 0,1 – 0,3 μm [32] durch koordiniertes, rhythmisches Schlagen die Mukusschicht mit einer Geschwindigkeit von 2 – 25 mm/min [33] in Richtung des Rachenraums transportieren.

Dieser kontinuierliche Abtransport des Nasenmukus wird auch als mukoziliäre Clearance bezeichnet und stellt eine effektive Abwehrfunktion des Körpers gegen inahierte Schadstoffe dar. Der Nasenmukus besteht aus Wasser, löslichen Proteinen und hochmolekularen Glykoproteinen, die in unterschiedlichen Anteilen eine untere **Solschicht** sowie eine darüber liegende viskose **Gelschicht** bilden. Die Glykoproteine, auch Muzine genannt, sind verant-

wortlich für die Gelstruktur des Mukus und geben ihm seine viskoelastischen Eigenschaften, die wiederum Einfluss nehmen können auf die Arzneistoffabsorption.

3.2.2 ENZYME

Die Enzymaktivität in der Nasenmukosa ist verhältnismäßig hoch und übersteigt in einzelnen Fällen sogar die Werte der Leber. Aus diesem Grund spricht Sarkar [14] von einem alternativen First-pass-Effekt, den nasal applizierte Substanzen durch einen enzymatischen Metabolismus erfahren. Vor allem Enzyme des Cytochrom P-450-Systems zeigen beachtliche Aktivitäten. Weitere Phase I-Enzyme in der Nasenmukosa sind Monooxygenasen, Aldehyddehydrogenasen, Epoxidhydrolasen, Carboxylesterasen und Carboanhydrasen. Enzyme, die an Konjugationsreaktionen teilhaben (Phase II-Enzyme), scheinen geringere Aktivitäten in der Nasenmukosa zu haben [34]. Aus dieser Gruppe nachgewiesen sind die Glukuronyl-, Sulfat- und Glutathiontransferase [14].

Für einige Peptide und Proteine, die nach oraler Gabe durch Peptidasen und Proteasen im Gastrointestinaltrakt relativ schnell inaktiviert werden, kann die nasale Applikation eine Alternative darstellen. Allerdings wurden auch in der Nasenmukosa Aminopeptidasen, Diaminopeptidasen, Dipeptidasen, Serinproteinasen, Cysteinproteinasen und Metalloproteinasen nachgewiesen [32]. Diese Enzyme sind sowohl an der Oberfläche der Mukosa als auch in den Epithelzellen vorhanden, wobei die Aminopeptidase-Aktivität vorherrschend ist [6], und in der Lage, nasal applizierte Peptide bzw. Proteine zu metabolisieren.

3.3 Auge und Nase als Applikationsorgane für Arzneistoffe

Die beiden Sinnesorgane Auge und Nase liegen in unmittelbarer Nachbarschaft und stehen über den Tränen-Nasen-Kanal miteinander in Verbindung. Üblicherweise werden Arzneimittel an beiden Organen für eine lokale Therapie eingesetzt. Der einfach zu bewerkstelligende und weitgehend schmerzfreie Zugang zur Augenoberfläche bzw. der Nasenhöhle bietet aber auch ideale Voraussetzungen für die Applikation systemisch wirkender Substanzen, vor allem bei wiederholten Anwendungen. Darüber hinaus gestattet dieser alternative Applikationsweg die Umgehung des First-Pass-Effekts und ermöglicht aufgrund guter kapillarer Durchblutung, insbesondere der Nasenschleimhaut, eine schnelle Resorption. Unter dem Gesichtspunkt der Absorption von Arzneistoffen weisen beide Organe

jedoch unterschiedliche anatomische und physiologische Voraussetzungen bzw. Bedingungen auf (Tabelle 2).

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Absorptionsvoraussetzungen von Auge und Nase

Auge	Nase
<i>Physiologie und Eigenschaften der Membranen</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Differenzierte Absorptionsbarrieren: Kornea, Sklera und Konjunktiva mit sehr unterschiedlichen Permeabilitäten • Keine Blutgefäße in der Kornea; systemische Resorption über Sklera, Konjunktiva oder nach Permeation der Kornea durch innenliegende Augenorgane (v.a. Iris-Ziliarkörper) und das Kammerwasser • Vergleichsweise kleine Absorptionsfläche • Appliziertes Arzneimittel läuft sehr schnell über Tränen-Nasen-Kanal in die Nase (systemischer Weg) und/oder über den Lidrand auf die Wangen (Verlust) ab 	<ul style="list-style-type: none"> • Gesamte Absorptionsfläche mit nahezu einheitlicher Permeabilität • Enger Kontakt zu dichtem Kapillarnetz: dadurch schneller Abtransport der permeierten Substanz • α-Rezeptoren steuern Blutfluss: beeinflussbar durch Umgebungsfaktoren, wie Luftfeuchtigkeit und Temperatur, sowie durch psychologische Faktoren [35] • Applizierter Arzneistoff kann über α-Rezeptoren seine eigene systemische Resorption beeinflussen (Bsp. α-Mimetika) • Direkter Zugang zum ZNS über olfaktorisches System [36, 37] • Relativ große Absorptionsfläche • Überschüssiges Arzneimittel wird in den Rachenraum transportiert und verschluckt; max. Applikation = 150 μl
<i>Einflussnahme der Sekrete</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Tränenfluss kann bei Reiz (vgl. Tabelle 3) deutlich gesteigert werden • Verabreichtes Volumen einer Formulierung steht in der Regel in deutlichem Überschuss zur vorhandenen Tränenmenge 	<ul style="list-style-type: none"> • Im Verhältnis zur Fläche weniger Sekret vorhanden als am Auge • Krankhafte Veränderungen des Sekretflusses (z.B. Steigerung um das 10fache bei Rhinitis) beeinflussen Absorption

(Fortsetzung Tabelle 2)

Schutzfunktionen der Organe

- Reflexartiger Lidschlag, der in der Regel nicht beeinflusst wird durch Arzneistoffe oder Grundlagen
- Mukoziliäre Clearance, die durch Arznei- oder Hilfsstoffe relativ stark beeinflusst werden kann

Enzymbarriere

- Lysozym-Konzentration im Tränenfilm höher als in jeder anderen Körperflüssigkeit
- Enzymaktivitäten im Gewebe vorhanden, aber nicht bemerkenswert hoch
- Sehr hohe Enzymaktivitäten sowohl im Mukus als auch im Epithel
- Durch Mengen- und Flächenverhältnisse geringerer bzw. schneller abgesättigter enzymatischer Umsatz als im Gastro-Intestinal-Trakt

Arzneizubereitungen sollten für beide Organe möglichst reizfrei und an die physiologischen Bedingungen von Tonizität und pH-Wert angeglichen sein. Vor allem am Auge bewirkt eine Unverträglichkeit zusätzlichen, starken Tränenfluss, der den Arzneistoff ausschwemmt, bevor seine Resorption erfolgen kann. Mit Hilfe von Rezepturoptimierungen lässt sich die Verweildauer einer applizierten Substanz modifizieren und damit die Bioverfügbarkeit sowohl nach okularer als auch nach nasaler Gabe verbessern. Alternativen hierfür sind beispielsweise ölige bzw. mehrphasige Grundlagen oder Viskositätserhöher, wie Cellulose-derivate, Hyaluronsäure oder Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon. Darüber hinaus eignen sich Trägersysteme, wie Liposomen, Nanopartikeln, Submikronemulsionen [38] oder Inserte [39] zur Steuerung der Arzneistofffreisetzung und gezielten Arzneistoffabsorption. Eine Auflistung modifizierter nasaler Zubereitungen haben Behl et al. [35] in einem Übersichtsartikel veröffentlicht. Beispiele für die okulare Verwendung solcher spezialisierter Systeme sind in einem Buchbeitrag von Keipert [40] zusammengestellt worden.

Der Einfluss physikalisch-chemischer Formulierungsparameter auf die Permeabilität von Kornea und Mukosa ist in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Um die systemische Arzneistoffresorption zu verbessern, können sogenannte Enhancer, wie z.B. Dimethylsulfoxid, Tenside, Alkohole, Chelat-Bildner, ätherische Öle, Gallensäuresalze oder auch einige CD, eingesetzt werden, die auf unterschiedliche Weise die Absorption der Wirksubstanz beeinflussen [41, 42].

Tabelle 3: Einfluss von Formulierungsparametern auf die Absorption von Arzneistoffen nach okularer und nasaler Applikation

Auge	Nase
<i>pH-Wert</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Physiologischer pH-Bereich der Tränenflüssigkeit: 6,5 – 7,6 • Toleranz durch das Tränen-Puffer-System im Bereich von pH 5,5 – 9,7 • Unphysiologische pH-Werte haben starken Tränenfluss und u.U. Membranschädigung zur Folge • Nicht-ionisierbare Arzneistoffe haben Absorptionsmaximum bei physiologischem pH [27] • Für ionisierbare Substanzen kann die Absorptionserhöhung bei Vorliegen der undissoziierten Form trotz Reizung erheblich sein 	<ul style="list-style-type: none"> • Physiologischer pH-Bereich des Mukus: 5,5 – 6,5 • pH-Werte < 3 bewirken histologische Veränderungen des Gewebes [35] • Einfluss des pH-Werts auf die Zilientätigkeit • Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität (nachgewiesen für 17β-HSD [43]) • Bessere Permeabilität für hydrophile Substanzen bei geringeren pH-Werten durch Hydratation des Gewebes [27]
<i>Tonizität</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Physiologischer Bereich für die Tränenflüssigkeit: 286 - 304 mOsmol/kg • Schmerzfrier Bereich: 225 - 430 mOsmol/kg • Änderungen der Tonizität haben Absinken des Membranwiderstands zur Folge Einfluss auf parazellulär permeierende Substanzen [44] 	<ul style="list-style-type: none"> • Physiologischer Bereich: 280 - 300 mosmol/kg (entspricht Isotonie) • Hypertone Lösungen bewirken Anstieg der Arzneistoff-Absorption durch Wasserentzug des Epithels [27, 45] • Permeabilitätsanstieg für hydrophile Arzneistoffe auch durch hypotone Lösungen aufgrund einer Schwellung der Membran [46]
<i>Verteilungskoeffizient</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Durch wechschelschichtigen Aufbau der Kornea parabolischer Zusammenhang zwischen VK und P_{eff} [47] • VK_{okt} Optimum von 100 - 1000 	<ul style="list-style-type: none"> • Membran besitzt hauptsächlich lipophilen Charakter • Steigende Permeabilität mit zunehmender Arzneistoff-Lipophilie • Gegenüber anderen Mukosae aber auch für hydrophile Substanzen gut permeabel [48]

(Fortsetzung Tabelle 3)

Teilchengröße

- Porengröße Kornea-Epithel 2,0 nm [19]
- Porengröße Konjunktiva-Epithel 3,0 – 4,9 nm [19]
- Permeation durch Poren im kornealen Epithel nur möglich für Moleküle mit einem Gewicht unterhalb 500 g/Mol [19]
- Limitierende Molekülgröße für eine Permeation durch die Gesamt-Kornea liegt zwischen 182 und 5000 g/Mol [20]
- Porengröße 0,4 – 0,8 nm [32]
- Molekülgröße und Permeation verhalten sich umgekehrt proportional [6]

Beispielsweise kann die Membranfluidität erhöht (z.B. Natriumlaurylsulfat, Benzalkoniumchlorid), die Viskosität der Mukusschicht erniedrigt (z.B. Gallensäuresalze) oder der Verband der Tight-junctions gelockert werden (z.B. EDTA, manche CD). Weiterhin lässt sich die Arzneistoffresorption durch Steigerung der Durchblutung (z.B. Ethanol) oder Inhibierung der enzymatischen Aktivität (z.B. Bacitracin oder Boroleucin als Peptidase-Inhibitoren) verbessern. Interessant ist der Einsatz von Enhancern vor allem dann, wenn der Durchtritt durch die Membran den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Resorption eines Wirkstoffs darstellt.

3.4 Verwendete Wirkstoffe

3.4.1 ANDROSTENDION UND TESTOSTERON

4-Androsten-3,17-dion (Androstendion, AD) bildet die physiologische Vorstufe des Testosteron (TST) und gehört damit zur Gruppe der Androgene. Die Strukturen beider Substanzen sind in Abb. 6 bzw. Abb. 7 dargestellt. AD besitzt eine rel. Molmasse von 286,42 und einen Schmelzbereich von 173 – 174 °C [49]. Die rel. Molmasse von TST beträgt 288,4, und der Schmelzbereich dieser Substanz liegt bei 152 - 157 °C [1]. Beide Wirkstoffe sind löslich in Ethanol, Methanol und Aceton, zeigen jedoch eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit (für AD vgl. Kap. 4.1.4.2).

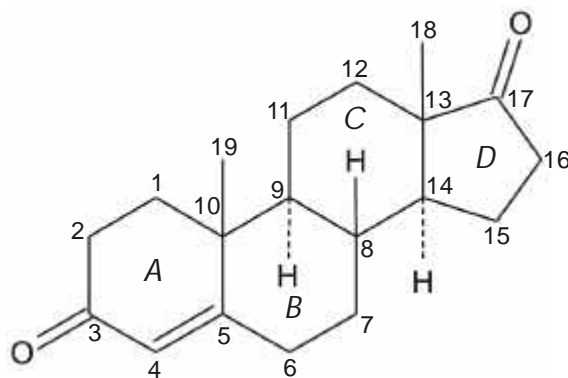


Abb. 6: 4-Androsten-3,17-dion (Androstendion, AD)

Die physiologischen und pharmakologischen Wirkungen der Androgene lassen sich einteilen in sexualspezifische, wie die Funktion der Geschlechtsdrüsen, Reifung der Samenzellen und die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale beim Mann, sowie in sexualunspezifische, wie eine proteinanabole Wirkung, ein Einfluss auf Knochenreifung und Längenwachstum und auf die Funktion der Talgdrüsen. Die tägliche Testosteronproduktion beim Mann beträgt ca. 7 mg und ruft eine Serumkonzentration von 3-10 µg/l hervor [50], wobei das Hormon im Blut zu 98% an das Transporthormon SHBG (**S**exual**h**ormon-**b**indendes **G**lobulin) gebunden ist.

Therapeutische Anwendung finden Androgene beim Mann beispielsweise in der Substitutionstherapie bei Androgenmangel durch Hypogonadismus oder im „Climacterium virile“ [11]. Weiterhin sind ein Unterdrücken übermäßigen Längenwachstums bei Knaben, sowie eine Stimulierung der Spermatogenese durch Erzielen eines Rebound-Effektes nach hoch-

dosierten Hormongaben möglich. Bei Frauen werden Androgene bei inoperablem Mammakarzinom eingesetzt. Ein weiteres potentiell Indikationsgebiet stellt neuerdings das Symptom des Trockenen Auges dar, wobei eine lokale Hormongabe sowohl die Tränen- als auch die Meibom-Drüsen in ihrer Funktion regulieren und somit den Tränenfilm stabilisieren soll [9, 10].

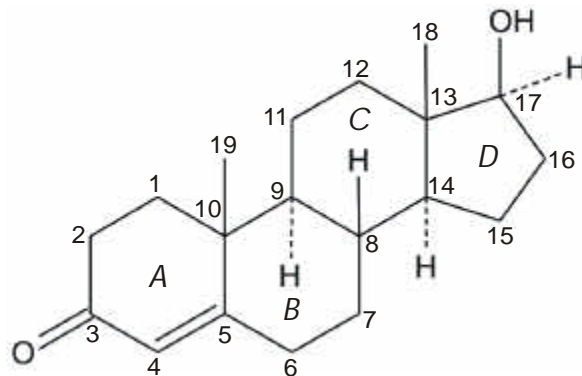


Abb. 7: 17b-Hydroxy-4-androsten-3-on (Testosteron, TST)

Durch die ungenügende Resorption des TST nach oraler Gabe muss eine Verabreichung auf alternativen Applikationswegen bzw. mittels modifizierter Arzneiformen oder als TST-Derivat erfolgen. Dabei ist man bemüht, einen Ersatz für die unkomfortable Injektion zu finden. Durch eine Veresterung von C17 oder eine Methylierung von C1 ist es gelungen, die orale Verfügbarkeit der Substanz zu verbessern. Eine galenische Alternative stellen Transdermale Therapeutische Systeme dar [51], die allerdings im Gegensatz zu den Hormonpflastern für die Frau wesentlich höhere Dosen freisetzen müssen. Aus diesem Grund wurde ein Handelsprodukt (Testoderm®, Fa. Ferring Arzneimittel GmbH, Wittland) entwickelt, das 15 mg TST enthält und auf der Skrotalhaut angewendet wird, da diese besonders gut durchblutet ist und kein ausgeprägtes Stratum corneum aufweist, wodurch eine gute Resorption des Hormons erfolgt. Ein weiteres Präparat stellt das Androderm® (12,2 mg TST) dar, das aufgrund eines beigefügten Enhancers (vgl. Kap. 3.3) auch auf nicht-skrotaler Haut angewendet werden kann, aber häufiger Hautreizungen auslöst [51].

3.4.2 FLUORESCEIN

Fluorescein ist ein Farbstoff und wird meist als wasserlösliches Natrium-Salz (2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)dinatriumbenzoat, FSC) eingesetzt. Abb. 8 zeigt seine Struktur. Die

Substanz ist leicht löslich in Wasser, wenig löslich in Ethanol und besitzt eine rel. Molekülmasse von 376,3.

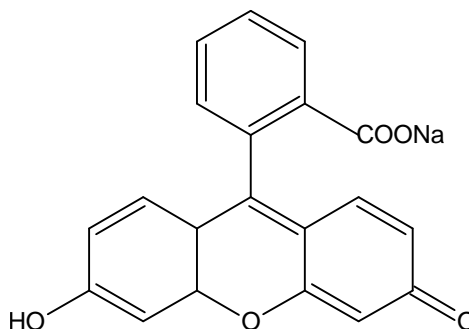


Abb. 8: 2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoesäure, Dinatriumsalz (Fluorescein-Na, FSC)

In der Augenheilkunde findet FSC in einer Konzentration von 2% als Diagnostikum zur Detektion kornealer Läsionen Anwendung. Durch die Anfärbung der Augenoberfläche kann bei darauffolgender Betrachtung durch die Spaltlampe die Korneaoberfläche untersucht werden. Die Substanz zeigt auch in stärkster Verdünnung (1: ~40 Mio.) eine gelbgrüne Fluoreszenz, die allerdings bei niedrigen pH-Werten verschwindet.

FSC wird in Permeationsstudien als Markersubstanz eingesetzt, um die Membranintegrität zu überprüfen [52] oder, beispielsweise als Isothiocyanat in Verbindung mit Dextran, die Porengröße einer Membran zu bestimmen [53, 54].

3.5 Verwendete Hilfsstoffe

Da in den nachfolgenden Untersuchungen Interaktionen zwischen den untersuchten Wirkstoffen und den Einzelkomponenten der getesteten bzw. entwickelten ME von Relevanz sein werden, sollen die verwendeten Hilfsstoffe in diesem Kapitel kurz charakterisiert werden.

3.5.1 CREMOPHOR®EL

Cremophor®EL (CrEL) stellt ein Tensid mit einem HLB-Wert von 13 dar, dessen Grundkörper Glycerol mit drei Macrogolketten ($n = 35$) verethert ist, die wiederum jeweils endständig mit Ricinolsäure verestert sind. Daneben enthält das Produkt freies Macrogol, Glycerol-

Macrogol-Ether und Macrogolricinoleat. CrEL besitzt eine rel. molare Masse von 1630, eine Dichte von 1,05 – 1,06 g/ml und eine Viskosität von 700 – 850 mPa•s. Der pH-Wert einer 10%igen wässrigen Lösung beträgt 6 – 8. Oberhalb von 26 °C ist CrEL klar, bei niedrigeren Temperaturen lassen ungelöste Bestandteile die Substanz trüb erscheinen. Laut Herstellerangaben [55] zeigt das Tensid gute Schleimhautverträglichkeit, und am Kaninchenauge werden 20 – 30%ige wässrige Lösungen reizlos vertragen. CrEL ist weitgehend beständig gegen Elektrolyte und übersteht eine 30minütige Sterilisation im Autoklaven.

3.5.2 PROPYLENGLYKOL

Propylenglykol (PG) findet pharmazeutische Verwendung als Lösungsvermittler und Resorptionsförderer. Die Substanz ist mit Wasser, Ethanol und vielen ätherischen Ölen mischbar und besitzt eine rel. Molmasse von 76,09. Weitere Kennzahlen stellen die Dichte mit 1,0364 g/ml, die Viskosität mit 56 mPa•s und ein Siedebereich von 186 – 188 °C dar [26]. Für unverdünntes PG wird eine schwache Reizung am Kaninchenauge beschrieben. Die Substanz weist antimikrobielle Wirksamkeit auf, die in Konzentrationen oberhalb 5% der des Glycerols deutlich überlegen ist.

3.5.3 ISOPROPYLMYRISTAT

Als Fettkomponente in den ME (vgl. Kap. 4.1.2) wurde Isopropylmyristat (IPM) ausgewählt. Dieser Fettsäureester ist mit Pflanzen- und Mineralölen mischbar und wird häufig als Spreitungsmittel und Penetrationsförderer in Salbenrezepturen genutzt. Die Dichte von IPM beträgt 0,851 – 0,856 g/ml und seine rel. Molekülmasse 270,4. Bei Raumtemperatur bildet IPM eine klare, farblose, ölige Flüssigkeit mit einer Viskosität von 5 - 6 mPa•s.

3.5.4 CYCLODEXTRINE

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide, von denen die bekanntesten aus sechs (α -CD), sieben (β -CD) oder acht (γ -CD) ringförmig angeordneten Glukoseeinheiten aufgebaut sind. Die Moleküle besitzen die Form eines Kegelstumpfs mit Außendurchmessern von 1,4 – 1,7 nm. Die innere Kavität hat einen Durchmesser von 0,6 – 1,0 nm und weist einen hydrophoben Charakter auf, während das Molekül insgesamt hydrophil und damit zumeist sehr gut wasserlöslich ist. Aufgrund dieser Struktur können lipophile Substanzen teilweise oder ganz in die CD-Kavität eingeschlossen werden und dadurch

beispielsweise eine ausreichende Wasserlöslichkeit gewinnen [56]. Durch Substitution der OH-Gruppen an der Molekülaufenseite lassen sich der Charakter und die Eigenschaften des CD-Moleküls in weiten Grenzen variieren.

Die Inklusion einer Substanz erfolgt bevorzugt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen - es werden keine kovalenten Bindungen gebildet; Komplexbildung und -dissoziation unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht, das von der jeweiligen Komplexstabilitätskonstanten (vgl. Kap. 4.1.4.3) beeinflusst wird. Die Einschlüsse können in unterschiedlichen Verhältnissen gebildet werden, die von der räumlichen Struktur und Größe des jeweiligen Gastmoleküls bzw. vom Durchmesser und Charakter der CD-Kavität abhängig sind. Für die Qualität des Komplexes spielt weiterhin der Polaritätscharakter des zu inkludierenden Moleküls oder Molekülteils eine wesentliche Rolle. Übliche Komplexverhältnisse sind 1:1, 1:2 oder auch 3:2 [91].

Neben der bereits erwähnten Verbesserung der Wasserlöslichkeit und einer damit einhergehenden Erhöhung der Arzneistoffkonzentration kann die Komplexbildung eines Wirkstoffs mit einem CD weitere Vorteile bringen, wie z.B. Verbesserung der chemischen oder physikalischen Stabilität, Schutz vor Wechselwirkungen mit inkompatiblen Rezepturkomponenten oder auch Kaschierung von schlechtem Geruch oder Geschmack einer Substanz. Dabei bewirkt jedoch die Inklusion keine chemischen oder physikalischen Veränderungen an dem Gastmolekül selbst.

Einen breiten Überblick über die okulare sowie nasale Anwendung von substituierten CD geben Rajewski und Stella [57]. Dabei wird für CD, besonders bei okularer Anwendung, neben löslichkeitsverbessernden Eigenschaften auch eine Funktion als Carrier, der den lipophilen Arzneistoff durch die hydrophile Muzinschicht zur Epitheloberfläche der Kornea transportiert [16], beschrieben. Voraussetzung ist, dass die Dissoziation des CD/Wirkstoff-Komplexes schneller erfolgt als seine Elimination von der Augenoberfläche. Um dies zu gewährleisten, kann zusätzlich die Viskosität der Zubereitung erhöht werden [16].

Merkus et al. [58] führen in ihrem Übersichtsartikel eine Reihe von Beispielen an, in denen der Zusatz eines CDs die nasale Bioverfügbarkeit einer Substanz positiv beeinflusst oder überhaupt erst ermöglicht. Zu diesen Beispielen zählen u.a. Estradiol/Dimethyl- β -CD, Morphin/Dimethyl- β -CD, Dihydroergotaminmesylat/RAMEB (*randomly methylated β -cyclodextrin*), sowie Komplexe der hydrophilen Substanzen Buserelin/Dimethyl- β -CD, Calcitonin/methyliertes β -CD und Insulin/Dimethyl- β -CD. Die Toxizität der genannten applizierten CD wird insgesamt als vergleichsweise gering bewertet.

Die in dieser Arbeit verwendeten CD-Derivate sind das Hydroxypropyl- γ -CD (HP- γ -CD, $M_{\text{rel}} = 1355$, mittlerer molarer Substitutionsgrad: 0,6) sowie das kationisch substituierte 2-Hydroxy-3-trimethylammonio-propyl- β -CD (HTAP- β -CD, $M_{\text{rel}} = 1670$, mittlerer molarer Substitutionsgrad: nicht angegeben). Beide CD-Derivate weisen eine sehr gute Wasserlöslichkeit (HP- γ -CD = 80 g/100 ml und HTAP- β -CD = 50 g/100 ml, jeweils bei 25 °C) auf.

Für HP- γ -CD liegen Untersuchungen über die Hämolytische Aktivität [59], die Fähigkeit zur Bindung von Cholesterol [59] und über histologische Veränderungen an Schleimhaut [74] vor, die alle auf eine gute physiologische Verträglichkeit schließen lassen. Bei einer topischen Applikation am Auge wird HP- γ -CD als sicher erachtet [16]. Das unsubstituierte γ -CD zeigte jedoch in vitro in einer 5%igen Lösung geringe ziliostatische Effekte [59].

Über HTAP- β -CD liegen weniger Informationen vor. Loftsson und Brewster [60] beschreiben gute Lösungseigenschaften für HTAP- β -CD vor allem für saure Substanzen, die als Anion vorliegen können. Für das Hydroxypropyl-Derivat des β -CDs weist die Literatur eine Reihe von Untersuchungen auf, die insgesamt eine gute Verträglichkeit bei nasaler oder okularer [16, 58, 61, 106] sowie dermalen [62, 63] Anwendung bestätigen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Mikroemulsionssysteme

4.1.1 ALLGEMEINES

Als „Mikroemulsion“ (ME) werden tensidhaltige Mehrkomponentensysteme bezeichnet, die thermodynamisch stabil und transparent bis leicht opaleszierend sind. Diese Systeme sind zusammengesetzt aus einer wässrigen und einer öligen Komponente sowie einem Tensid und in der Regel einem Kotensid, dessen Aufgabe es ist, die Grenzflächenfluidität durch Störung und damit Auflockerung des Tensidfilms zu erhöhen [64]. Je nach Komposition können wasser-, öl- oder bikontinuierliche Systeme entstehen.

Über den genauen Aufbau dieser Systeme gibt es unterschiedliche Ansichten, und den zahlreichen, verschiedenartig zusammengesetzten Formulierungen liegen differenzierte Strukturen zugrunde. Bevorzugt ist eine ME als Lösung aller Komponenten ineinander zu beschreiben, deren Moleküle sich sehr rasch bewegen und in einem dynamischen Gleichgewicht stehen mit strukturierten Mikrobereichen [65 - 67]. Andere Strukturvorstellungen gehen von einem mizellaren Aufbau aus, wobei die Moleküle der in Mizellen eingeschlossenen Phase relativ frei beweglich sind. Man spricht in diesem Fall von „geschwollenen Mizellen“. Als weiteres Modell für den Aufbau einer ME sei hier die Vorstellung einer bikontinuierlichen Struktur genannt. In diesem Fall sind Wasser- und Ölphase, häufig bei annähernd gleichen Volumenfraktionen, schwammartig ineinander verteilt und durch einen flexiblen Tensidfilm voneinander getrennt [67].

ME können sehr vielseitig eingesetzt werden und als Darreichungsform Vorteile für die Verabreichung von Arzneistoffen auf unterschiedlichen Applikationswegen bieten. Beispielsweise kann bei topischer Anwendung einer ME eine erhöhte Penetration eines eingearbeiteten Arzneistoffs erreicht werden [66], da die Formulierung aufgrund geringer Grenzflächenspannungen relativ schnell in das Stratum corneum der Haut gelangt. Aufgrund der besonderen ME-Strukturen wird auf diese Weise der eingearbeitete Wirkstoff in relativ kurzer Zeit im Stratum corneum verteilt.

Als Beispiel eines Fertigarzneimittels auf ME-Basis sei das Sandimmun® Optoral genannt, das allerdings peroral verabreicht wird. Hier soll die schlechte Bioverfügbarkeit des

Wirkstoffs Ciclosporin durch die Verabreichung einer Ciclosporin-ME in einer Weichgelatine-kapsel verbessert werden.

Vielversprechend scheint auch die okulare Applikation von ME in wirkstofffreier oder -haltiger Form zu sein [68 - 71]. Durch den lipophilen Anteil in der Zubereitung ist einerseits eine erhöhte Verweildauer auf der Kornea des Auges zu erwarten im Gegensatz zu rein wässrigen Systemen, andererseits wird der physiologische hydrophil-lipophile Aufbau des Tränenfilms unterstützt. Darüber hinaus bietet eine Träger-ME ein hinreichendes Lösungsvermögen für lipophile Wirkstoffe, die ansonsten in einem rein lipophilen Träger, einer Makroemulsion oder als Suspension verabreicht werden müssten. Der gravierende Nachteil öliger oder ölhaltiger Zubereitungen am Auge ist die mögliche Sichtbehinderung, die zumeist nur eine Applikation zur Nacht erlaubt. Da ME transparent und niedrig-viskos sind, sollten sie das Sehvermögen jedoch in weit geringerem Maße als herkömmliche Formulierungen einschränken.

Für die Entwicklung einer nasalen Arzneiform sollte Beachtung finden, dass eine homogene, versprühbare Zubereitung entsteht, die sich mit einem handelsüblichen Zerstäuber dosieren lässt. Das setzt eine möglichst niedrig-viskose Formulierung voraus. ME-Formulierungen zeigen neben einer geringen Viskosität aufgrund ihres „mehrphasigen“ Aufbaus oft sehr gute Lösungseigenschaften für die einzuarbeitenden Wirkstoffe sowie eine gute Wassermischbarkeit. Diese drei Kriterien, Applizierbarkeit durch einen Zerstäuber, gute Lösungseigenschaften für den Wirkstoff und einen Wasseranteil über 10%, legten Li et al. [72] bei der Entwicklung ihrer ME-Grundlagen zur nasalen Anwendung zu Grunde.

4.1.2 ZUSAMMENSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei ME-Systeme untersucht, von denen zwei bereits früher in der Arbeitsgruppe entwickelt [73, 74] und teilweise charakterisiert wurden. Die Zusammensetzung der Systeme ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Alle drei Systeme sind mischbar mit Wasser und enthalten als lipophile Komponente 5% IPM sowie als Tensid das CrEL. Die Zubereitungen unterscheiden sich qualitativ durch die enthaltenen Kotenside:

Durch Zugabe von 9% PG entstand die Formulierung ME-PG, die von Haße [73] mit einer etwas niedrigeren PG-Konzentration (5%) als potentiell ophthalmologisches Trägersystem entwickelt und charakterisiert wurde. Das System ME-CD enthält HP- γ -CD und wurde von Berndt [74] im Rahmen seiner Dissertation als mögliches Trägersystem zur nasalen

Verabreichung von AD konzipiert. Die Kombination einer ME mit einem CD (β -CD bzw. -Derivate) wurde auch von Dalmora et al. [75, 76] sowie Maldonado und Lawrence [77] untersucht, wobei allerdings in deren Studien das CD der ME zusätzlich hinzugefügt wurde und nicht an deren Bildung im Sinne eines Kotensids beteiligt war.

Tabelle 4: Prozentuale Zusammensetzung [g/g] der Mikroemulsionen

Bestandteile	ME-PG	ME-CD	ME-ION
<i>Isopropylmyristat</i>	5	5	5
<i>Cremophor® EL</i>	20	20	15
<i>Propylenglykol</i>	9	-	-
<i>HP-γ-CD</i>	-	9	-
<i>HTAP-β-CD</i>	-	-	9
<i>Wasser</i>	66	66	71

Aus der Literatur ist eine Wechselwirkung zwischen kationischen Substanzen und Epithelzellen bekannt [78, 79]. Benita [80] beschreibt elektrochemische Wechselwirkungen zwischen einer positiv-geladenen Submikronemulsion und dem Kornea-Epithel von Ratten sowie Radikalfänger-Eigenschaften dieser Zubereitung. Klang et al. [81] berichten von einer Verbesserung der Befeuchtung der Augenoberfläche durch eine positiv geladene Submikronemulsion. Da diese Eigenschaft für eine okuläre Anwendung beim „Trockenen Auge“ vorteilhaft sein kann, wurde in der vorliegenden Arbeit durch Austausch von HP- γ -CD gegen das kationische CD HTAP- β -CD eine quantitativ geringfügig variierte ME mit ionischem Charakter formuliert (ME-ION).

Die Herstellung und Beschreibung der untersuchten ME ist im Kap. 5.2.2 beschrieben. Alle Systeme waren transparent und bildeten sich spontan nach Mischen der Komponenten. Um den Charakter und das Mischungsverhalten der ME zu beschreiben, wurden alle drei Zubereitungen mit eingearbeitetem Arzneistoff (AD) nach Vermischen mit einer wässrigen Methylenblau-Lösung makro- und mikroskopisch betrachtet (s. Kap. 5.2.3). Sie zeigten eine spontane und einheitliche Anfärbung. Ein ähnlich gutes Mischverhalten ergab sich für eine lipophile Oil-Red-O-Lösung in IPM, allerdings waren anfangs rote Schlieren und Tröpfchen der Farbstofflösung erkennbar, die erst nach mechanischer Durchmischung verschwanden.

Alle drei Systeme sind demnach als wasserkontinuierliche ME zu klassifizieren. Sie sind in der Lage, sowohl hydrophile als auch lipophile Zusätze aufzunehmen, ohne in mehrere Phasen zu brechen.

Darüber hinaus wurden alle drei Systeme durch ein Polarisationsmikroskop betrachtet. Alle Präparate waren klar und von gleichbleibender Helligkeit und Farbe, was das Vorliegen von optisch isotropen Mikroemulsionsstrukturen unterstreicht.

Die Formulierungen ohne Zusatz von Kotensid (Grundmischungen, GM) waren unmittelbar nach der Herstellung ebenfalls homogen und klar. Allerdings zeigte sich nach 24stündiger Lagerung (bei RT) eine leichte Opaleszenz, die sich nach weiteren 24 Stunden verstärkte und in eine deutliche Trübung überging. Eine Zugabe von Kotensid ist daher für die Stabilität der Formulierungen erforderlich.

Im Folgenden wurden die physikalisch-chemischen Parameter bestimmt sowie Stabilitäts- und Strukturuntersuchungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Inkorporierbarkeit des Wirkstoffs AD in die einzelnen Formulierungen untersucht. Für die Zubereitung ME-PG kann zusätzlich auf die Untersuchungen von Haße [73] verwiesen werden, deren System ME4 als Basis für ME-PG diente und lediglich im PG-Gehalt reduziert ist (5 : 9%, s. oben!). Die Strukturuntersuchungen von Haße [73] an ihrem System ME4 ergaben das Vorliegen von typischen ME-Strukturen wie gequollenen Mizellen und Mizellaggregaten.

Stabilität

Die physikalische Stabilität von ME-CD bzw. ME-ION wurde nach Lagerung bei drei verschiedenen Temperaturbereichen durch visuelle Betrachtung beurteilt. Dazu wurden die Zubereitungen autoklaviert (121 °C, $2 \cdot 10^5$ Pa, 15 min), wonach sich bei beiden Systemen keine sichtbaren Veränderungen zeigten. Jeweils sechs autoklavierte Proben wurden bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C), im Kühlschrank (2 bis 8 °C) bzw. im Gefrierschrank (-15 bis -18 °C) gelagert. Nach zunächst einwöchigen und dann jeweils vierwöchigen Zeitabständen wurde das Aussehen der Proben begutachtet.

Dabei zeigten die bei 2 - 8 °C gekühlten ME-CD-Proben nach sechs Wochen eine erste leichte Trübung, die bei Temperierung auf Raumtemperatur (RT) verschwand; nach 18 Wochen waren sie milchig-weiß und blieben auch nach Temperierung auf RT opaque-trüb. Drei der eingefrorenen Proben waren nach 18 Wochen unverändert klar, während die restlichen leicht opaque-trüb erschienen. Die durchgehend bei RT gelagerten Proben erschienen dagegen alle auch nach 18wöchiger Lagerung vollkommen klar.

Im Falle von ME-ION zeigten die bei den niedrigen Temperaturbereichen gelagerten Proben nach kürzeren Lagerzeiten als bei ME-CD erste Trübungen: die eingefrorenen Proben erschienen bereits nach einer Woche leicht opaleszierend und waren nach sechs Wochen alle milchig-weiß (jeweils nach Temperierung auf RT); die Proben aus dem Kühlschrank zeigten ebenfalls bereits nach einer Woche eine deutliche Trübung, die allerdings nach Temperierung auf RT verschwand; nach einer Lagerdauer von zwei Wochen behielten zwei Proben das opaque-trübe Aussehen auch bei RT, und nach 10 Wochen wurde keine der Proben mehr klar; die bei RT gelagerten ME-ION-Proben blieben jedoch über den gesamten Prüfzeitraum von 18 Wochen klar und unverändert.

Das System ME-PG wurde bereits von Haße ausführlich auf seine Stabilität geprüft, wobei über einen Zeitraum von 12 Wochen bei einer Lagertemperatur von 25 °C keine Veränderung des Aussehens sowie des mittleren Teilchendurchmessers (gemessen mittels PCS) festgestellt wurde [73].

Das verwendete Tensid, CrEL, zeigt selbst eine zunehmende Trübung bei Temperaturen unterhalb Raumtemperatur (laut Herstellerangaben bis 26 °C [55]) aufgrund der Bildung fester Assoziate, die in der flüssigen Substanz ausfallen. Aufgrund des Volumenanteils von 15 bzw. 20% in den ME ist eine Trübung der Systeme bei niedrigen Temperaturen möglicherweise auf ähnliche Phänomene wie in der Reinsubstanz des Tensids zurückzuführen. Des Weiteren können Instabilitäten der Einzelbestandteile der ME aufgrund durch Lichteinfluss oder durch Reaktion mit dem Glas der Primärverpackung veränderter physikalisch-chemischer Parameter des Systems nicht ausgeschlossen werden und zu Trübungen führen, da sich die thermodynamische Stabilität immer auf eine bestimmte Zusammensetzung bezieht [82]. Untersuchungen zur Stabilität des eingearbeiteten Wirkstoffs wurden nicht durchgeführt.

4.1.3 CHARAKTERISIERUNG

4.1.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die auffallendsten Eigenschaften einer ME sind ihre thermodynamische Stabilität und ihre Transparenz. Oftmals werden diese beiden Charakteristika daher als Hauptkriterien für die Definition einer ME herangezogen [64]. Für eine allgemeine Charakterisierung, besonders im Hinblick auf eine pharmazeutische Verwendung, können auch im Falle von ME physikalisch-chemische Parameter, wie Viskosität, pH-Wert, Tonizität und Oberflächenspannung, dienen.

Für eine nähere Strukturaufklärung kommen eine Vielzahl unterschiedlicher Analysemethoden zur Anwendung.

Definitionsgemäß soll in ME die Teilchengröße unterhalb 140 nm liegen [67]. Daher stellt diese ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Systeme dar. Als Methode zur Bestimmung der Teilchengröße kann beispielsweise die Elektronenmikroskopie dienen, die jedoch eine aufwändige Vorbereitung der Proben erfordert. Zudem können durch Einfrieren der Proben eventuelle Strukturänderungen verursacht werden, so dass allenfalls eine „statische“ Momentaufnahme des Systems erhalten wird [67]. Weiterhin stehen verschiedene Streulichtmethoden (z.B. Quasielastic Light Scattering [83], Small Angle Neutron Scattering [97]) zur Verfügung, zu denen auch die in dieser Arbeit angewandte Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS, vgl. Kap. 4.1.3.4) gehört. Diese Methoden bieten den Vorteil, dass auch Wechselwirkungen zwischen den „Teilchen“ erfasst und mittels deren Translationsbewegungen zusätzliche Aussagen über das Vorliegen bzw. den Aufbau von Assoziaten innerhalb des Mikroemulsionssystems getroffen werden können [65, 84].

Darüber hinaus kann mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS), die ein dynamisches Lichtstreuverfahren darstellt, eine Detektion der Partikelgrößen durch Messen der Fluktuation von Brechungsintensitäten über die Zeit, hervorgerufen durch die Braun'sche Molekularbewegung der Teilchen [67], vorgenommen werden [85 - 87]. Um interpartikuläre Interferenzen möglichst zu vermeiden, sollte die Probe ausreichend verdünnt sein und ihre „innere Phase“ einen Anteil von 5-10% nicht übersteigen. Darüber hinaus kann die Polydispersität eines Systems bestimmt und daraus die Partikelgrößenverteilung ermittelt werden. Allerdings sollte zuvor weitgehend Klarheit über die generelle Systemstruktur bestehen, da PCS-Messungen einer bikontinuierlichen ME nur bedingt sinnvoll interpretiert werden können [85].

Weiterhin ist von Interesse, eine ME abzugrenzen von flüssigkristallinen Systemen, was beispielsweise mittels der Betrachtung im Polarisationsmikroskop [64, 65] (vgl. Kap. 4.1.2) gelingt. Auch die Kernresonanzspektroskopie kann Auskunft geben über flüssigkristalline Bereiche in einem System und darüber hinaus Hinweise über Wechselwirkungen zwischen Tensiden und Kotensiden [67]. Die „Phasenlage“ einer Formulierung kann ebenso wie in einer Makroemulsion durch Leitfähigkeitsmessungen [64] bestimmt werden. Informationen zu Wechselwirkungen des eingearbeiteten Wassers bzw. Änderungen des Energieinhalts des Systems sind mittels Differenzialthermoanalyse (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) zu erzielen [88, 89] (vgl. Kap. 4.1.3.3).

Neben den hier erwähnten Untersuchungstechniken können im Einzelfall weitere Methoden sinnvoll sein. Welche Methoden für die einzelnen Formulierungen Anwendung finden, hängt in hohem Maße von der spezifischen Zusammensetzung der jeweiligen Zubereitung ab. Es ist schwierig, nicht zuletzt aufgrund der unterschiedlichen Strukturtheorien, konkrete Aussagen zu treffen über den genauen Aufbau einer entwickelten Mikroemulsion.

4.1.3.2 Physikalisch-chemische Parameter

Die physikalisch-chemischen Parameter wurden in der Regel jeweils für die wirkstofffreien Systeme ermittelt. Tabelle 5 gibt die einzelnen Messwerte für die drei untersuchten ME-Formulierungen wieder. Die Durchführung der einzelnen Messungen ist in Kap. 5.2.5 beschrieben.

Die Viskositäten der drei Zubereitungen nehmen in der Reihenfolge ME-ION < ME-CD < ME-PG zu, liegen aber alle in dem für Augenarzneien empfohlenen Bereich von 10 – 25 mPa•s [26]. Eine Berechnung der Gesamtviskositäten der Systeme als Summe der anteiligen Einzelviskositäten der jeweiligen Komponenten ergab in jedem Fall höhere Werte von 117,25 mPa•s für ME-ION, 156,25 mPa•s für ME-CD (die CD bleiben jeweils unberücksichtigt) und 161,29 mPa•s für ME-PG. Da die gemessenen, tatsächlichen Werte lediglich in der Reihenfolge jedoch nicht in der Größenordnung mit den errechneten Werten übereinstimmen, werden Wechselwirkungen zwischen Tensid und jeweiligem Kotensid vermutet, die geänderte Strukturen in den ME verbunden mit einer deutlich reduzierten Viskosität zur Folge haben.

Alami et al. [90] haben Komplexbildung zwischen hydroxypropylierten CD (α , β , γ) und einem neu entwickelten nicht-ionischen Tensid mittels SANS (*small angle neutron scattering*) nachgewiesen und ein Aufbrechen der Mizellen detektiert. Die Interaktionen mit HP- β -CD waren hierbei am deutlichsten. Derartige Wechselwirkungen sind auch in den ME denkbar, wobei unterschiedliche Qualitäten dieser Interaktionen möglicherweise für die deutlich verschiedenen Viskositäten verantwortlich sein können.

Tabelle 5: Physikalisch-chemische Parameter der Mikroemulsionen

	ME-PG	ME-CD	ME-ION
<i>Viskosität [mPa•s] (25 °C)</i>	24,43 ± 0,130	14,35 ± 0,157	6,22 ± 0,056
<i>Dichte [g/cm³] (25 °C)</i>	1,012	1,035	1,028
<i>pH (RT)</i>	6,86	6,8	6,5
<i>Brechungsindex (25 °C)</i>	1,380	1,382	1,372
<i>Tonizität [mOsmol/kg]</i>	2296 ± 36,5 ⁺	211 ± 0,71	310 ± 6,85
<i>Oberflächenspannung [mN/m] (RT)</i>	32,61 ± 0,03	30,96 ± 0,10	30,69 ± 0,12
<i>Leitfähigkeit [μS/cm] (25 °C)</i>	144,0 (bei einem Zusatz von 5% PG, [73])	148,6	6606

⁺ gemessen für ME-PG mit 25 μg/ml FSC

Wechselwirkungen zwischen CD und CrEL könnten sich weiterhin auf die Oberflächenspannung auswirken. In der oben zitierten Literatur [90] wird ein Anstieg der Oberflächenspannung als Folge der beschriebenen Komplexbildung zwischen Tensid und CD erwähnt. Für einfache, wässrige Mischungen aus CrEL und HP-γ-CD bzw. HTAP-β-CD konnte hier ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Oberflächenspannungen ermittelt werden (Tabelle 6). PG blieb dagegen ohne messbaren Einfluss auf die Oberflächenspannung der 20%igen Tensidlösung (Tabelle 6).

Im Gegensatz dazu war die Oberflächenspannung in den ME-Systemen generell reduziert und lag zwischen 30,7 und 32,6 mN/m (Tabelle 5). Wenn man von den allgemeinen Strukturvorstellungen von ME ausgeht, wonach Tensid und Kotensid vollständig die Grenzflächen zwischen Öl- und Wasser-Bereichen belegen [66], könnte auch im vorliegenden Fall eine zusätzliche Reduzierung der Oberflächenspannung auf eine Oberflächenbelegung nicht nur mit Tensid, sondern auch mit Kotensid zurückgeführt werden. Die in den Mischungen aus Tabelle 6 beobachteten Effekte auf die Oberflächenspannung treten in den ME-Systemen offensichtlich nicht mehr auf, was das Vorliegen von geänderten Strukturen in den ME unterstreicht.

Tabelle 6: Oberflächenspannung verschiedener Cremophor® EL-Mischungen

<i>CrEL (20%)</i>	36,33 ± 0,02 mN/m
<i>CrEL (20%) + HP-β-CD (9%)</i>	37,61 ± 0,17 mN/m*
<i>CrEL (15%) + HTAP-β-CD (9%)</i>	38,31 ± 0,20 mN/m*
<i>CrEL (20%) + PG (9%)</i>	36,35 ± 0,15 mN/m

gemessen bei 22 °C

* = signifikant ($p < 0,01$)

Die Werte für Dichte, pH-Wert und Brechungsindex liegen für alle ME in der gleichen Größenordnung und lassen keine Unverträglichkeiten im Falle einer okularen oder nasalen Anwendung vermuten. Anders verhalten sich die Tonizitäten der Formulierungen. Im physiologisch verträglichen Bereich (280 - 300 mosmol/kg) liegt annähernd nur der Wert von ME-ION. ME-CD ist hypoton und sollte durch Zusatz eines Isotonisierungsmittels an den physiologischen Tonizitätsbereich angeglichen werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass ein Arzneistoffzusatz in jedem Fall einen Anstieg der Tonizität zur Folge hat. ME-PG ist stark hyperton¹ und kann vermutlich nicht schmerzfrei appliziert werden.

Die Leitfähigkeit liegt für alle Systeme deutlich über der des destillierten Wassers (1 μ S/cm) und weist wie zu erwarten bei der ionischen ME (ME-ION) den höchsten Wert auf. Die Formulierungen sind demnach alle wasserkontinuierlich, wobei ein Austausch der beiden Koteside HP- γ -CD und PG die Leitfähigkeit der entsprechenden ME kaum beeinflusst.

Weiterhin wurden für alle Systeme Messungen der Dielektrizitätskonstanten (DK) durchgeführt. Mittels der hier verwendeten Methode konnten jedoch keine Werte bestimmt werden, da der zulässige Höchstwert von 80 bei allen Zubereitungen überschritten wurde.

4.1.3.3 DSC-Messungen

Bei der Methode der Differentialthermoanalyse (*differential scanning calorimetry*, DSC) können Temperaturänderungen in einer Probe detektiert werden, die durch physikalische oder chemische Effekte während einer standardisierten Erwärmung hervorgerufen werden.

¹ Der Arzneistoffzusatz (25 μ g/ml FSC) bewirkt rechnerisch einen Tonizitätsanstieg von 0,2 mosmol/kg und kann damit in diesem Fall vernachlässigt werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgt, indem die Probe neben einer Vergleichssubstanz durch einen definierten Wärmefluss erhitzt und über ein getrennt angebrachtes Thermoelement die von ihr abgegebene oder aufgenommene Wärmemenge registriert wird. Eine Kompensationsheizung hält dabei die Temperatur in der Probe mit der Temperatur in der Vergleichssubstanz auf gleicher Höhe. Ein endothermer Vorgang in der Analyse ergibt daher ein positives Signal des Wärmeflusses, da von der Heizquelle zusätzliche Wärme abgegeben werden muss. Der Wärmefluss [J/s] wird mit zunehmender Temperatur aufgezeichnet, und aus den resultierenden Peakflächen kann die von der Probe abgegebene oder aufgenommene Wärmemenge errechnet werden.

In der Pharmazie wird die DSC unter anderem eingesetzt zur Überprüfung der Reinheit und Identität von Substanzen sowie zur Bestimmung von Wärmekapazität und Schmelzwärme [91]. In dieser Arbeit sollte die Wärmemenge bei der ME-Bildung erfasst werden. Dazu wurden Mischungen von Tensid und Lipid bzw. von Wasser und Kotensid, entsprechend der Vorgehensweise bei der ME-Herstellung (vgl. Kap. 5.2.2), getrennt voneinander vortemperiert und nachfolgend durch Rotieren des Thermostaten miteinander vermischt. Von besonderem Interesse waren der Einfluss des Kotensids sowie des eingearbeiteten Arzneistoffs AD, was am Beispiel von ME-CD untersucht wurde.

In Tabelle 7 sind die Mischungsenthalpien aufgeführt, die für ME-CD mit 7%, 9% und 11% Kotensid sowie unter Zusatz von 25 µg/ml AD zu ME-CD (9% HP-γ-CD) ermittelt wurden (s. Kap. 5.2.6). Alle Enthalpie-Werte waren exotherm, d.h. Wärme wurde vom System abgegeben, und wiesen zwischen den getesteten Zubereitungen keine signifikanten Unterschiede auf. Darüber hinaus wurde das Dreikomponentensystem, IPM, CrEL und Wasser, d.h. ohne HP-γ-CD, vermessen. Ohne Kotensid erfolgte jedoch keine vollständige Vermischung von IPM/CrEL mit dem Wasser, so dass im inneren Zylinder Reste der IPM/CrEL-Mischung verblieben.

Als Hauptursache für die gemessenen Wärmeeffekte werden Wechselwirkungen des Wassers mit den anderen Komponenten angesehen. Die Menge an zugesetztem Kotensid hatte dabei auf die freigesetzte Wärmemenge keinen messbaren Einfluss. Jedoch schien das Kotensid ein Vermischen der Komponenten zu beschleunigen.

Tabelle 7: Mischungsenthalpien von ME-CD mit unterschiedlichem Kotensid-Gehalt und Androstendion

Zubereitung ME-CD	Mischungsenthalpie [J/g]
<i>mit 7% HP-β-CD</i>	11,45 \pm 0,87
<i>mit 9% HP-β-CD</i>	12,09 \pm 0,19
<i>mit 11% HP-β-CD</i>	11,88 \pm 0,11
<i>mit 25 μg/ml AD</i>	12,05 \pm 0,06

Haße [73] unternahm DSC-Messungen unter anderem an ME-PG mit 5% PG, indem zur Mischung aus Wasser, IPM und CrEL das Kotensid PG zugegeben wurde. Die ermittelte Enthalpie war ebenfalls exotherm, lag jedoch mit 30,1 J/g deutlich höher als die hier detektierten Mischungsenthalpien. Vermutlich wurde bei der Messung von Haße [73] der höhere Wert unter anderem durch den Lösungsvorgang des PG verursacht, während bei den vorliegenden Untersuchungen das Kotensid (HP- γ -CD) vor dem Mischungsvorgang bereits im Wasser gelöst vorlag. Da jedoch in diesen beiden Untersuchungen unterschiedliche Einzelkomponenten beteiligt waren, ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht aussagekräftig.

Eine Interpretation und Einordnung der DSC-Ergebnisse gestaltet sich schwierig, da die gemessenen Absolut-Werte abhängig sind von der jeweiligen Vorgehensweise. So können grundsätzlich Messungen im Scanning-Betrieb, wobei die zuvor gefrorene Probe kontinuierlich erhitzt wird und dabei Schmelzenthalpien detektiert werden, oder wie im vorliegenden Fall im isothermen Messbetrieb durchgeführt werden. Bei isothermen Messungen bestehen in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung unterschiedliche Möglichkeiten, die Einzelkomponenten zu mischen, was zu abweichenden Ergebnissen führt. Eine Übersicht von Literaturdaten zur DSC-Analytik von ME hat Kielhorn [89] in seiner Arbeit zusammengestellt: Rosano et al. [92] ermittelten beispielsweise durch isotherme DSC-Messungen die notwendige Menge an Kotensid für eine entwickelte ME, indem Mischungsenthalpien nach Zugabe unterschiedlicher Kotensid-Konzentrationen detektiert wurden.

4.1.3.4 Röntgenkleinwinkelstreuung

Eine weitere Methode zur Strukturaufklärung der ME stellt die Röntgenkleinwinkelstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS) dar, wofür es bereits einige Literaturdaten gibt [93 - 97]. Das Prinzip der Röntgenstreuung beruht allgemein auf der Beugung von Röntgenstrahlen an geordneten Strukturen in einer Probe und der Detektion der hervorgerufenen Streumuster. Vor allem zur Analyse kristalliner Strukturen leistet die Röntgenstreuung einen wertvollen Beitrag. Dabei werden Reflexe im Bereich größerer Streuwinkel detektiert. Demgegenüber werden die SAXS-Streumuster in einem Winkelbereich von 0-10° untersucht und erfassen Strukturen mit einer Größenordnung von 1-50 nm.

Aufgrund der speziellen ME-Strukturen ergeben sich charakteristische Diffraktogramme mit einem einzelnen breiten Peak und einem flachen Kurvenverlauf für große x-Werte [94]. Die Lage des Peak-Maximums wird beeinflusst durch die Tensid-Konzentration [94, 96]. Das Wasser/Öl-Verhältnis in der Zubereitung nimmt Einfluss auf die Peak-Höhe [94].

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse für die Messungen¹ der Zubereitungen ME-CD und ME-ION sowie davon abgeleitete Rezepturvarianten; dabei sind die ermittelten Intensitäten gegen den reziproken Abstand (s) der „Teilchen“ aufgetragen. In Kap. 5.2.7 sind die Versuchsbedingungen beschrieben. Beide Systeme wurden jeweils auch ohne CD-Zusatz vermessen, ME-CD darüber hinaus mit Arzneistoffzusatz (25 µg/ml AD) und nach vorherigem Autoklavieren der Zubereitung. Als Vergleich wurde eine 20%ige Lösung von CrEL in Wasser untersucht.

Die ermittelten ME-Kurven zeigen den für Mikroemulsionen oben beschriebenen, charakteristischen Verlauf (Abb. 9). Bei der Messung der Tensid-Wasser-Lösung (schwarze Kurve) resultierte dagegen ein deutlich differenzierter Kurvenverlauf. Es ist davon auszugehen, dass sich die Tensidmoleküle in wässriger Lösung zu unterschiedlich großen Mizellen zusammenlagern, die im Gleichgewicht stehen zu einzelnen Molekülen oder Molekül-Dimeren [26]. Im Bereich von $s = 0,1 - 0,15$ lässt sich ein schwaches Maximum erkennen (Abb. 9), das durch Streuungen an den unterschiedlich großen Mizellen erklärbar sein könnte. Vorwiegend lamellare Strukturen ergeben dagegen schmalere Peaks [97] und können hier für die 20%ige CrEL-Lösung weitgehend ausgeschlossen werden.

¹ An dieser Stelle sei Frau Ingrid Zenke am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam, sehr herzlich für die Durchführung der Messungen und die Unterstützung bei der Auswertung der Daten gedankt.

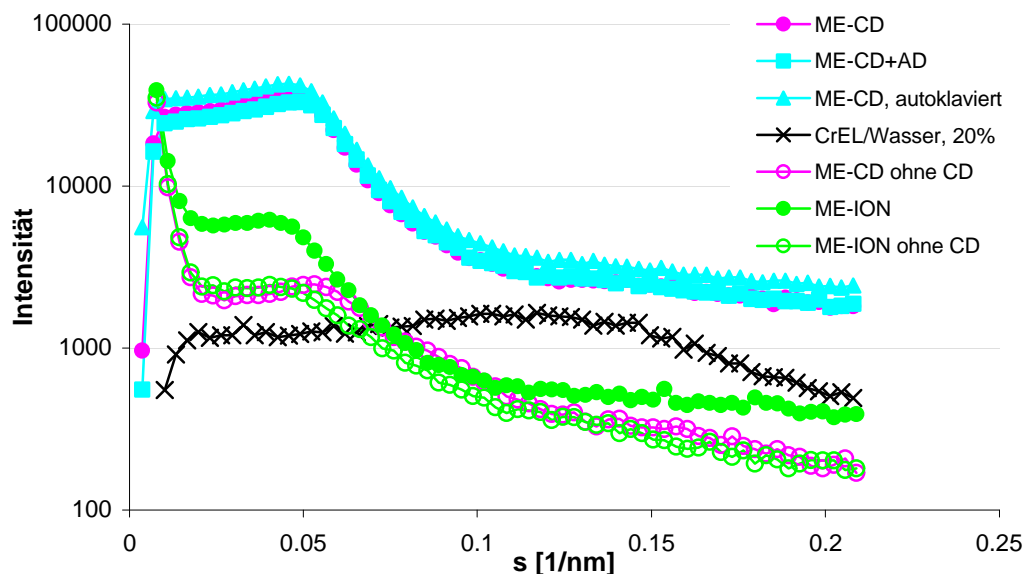


Abb. 9: SAXS-Diffraktogramme der Zubereitungen ME-CD, ME-ION sowie einer CrEL-Lösung (20% in Wasser)

Alle ME und deren Rezepturvarianten führten zu Intensitätsmaxima bei s -Werten um 0,05. Dieser Wert entspricht einem größeren Abstand der „Teilchen“ als bei der CrEL-Lösung, was für die in ME angenommenen Strukturen im Gegensatz zu mizellaren Lösungen auch zu erwarten ist. Die vermutlich als Solubilisat vorliegenden Grundmischungen (GM, vgl. Kap. 4.1.2) zeigten annähernd den für ME typischen Kurvenverlauf, wobei jedoch der breite Peak wesentlich weniger ausgeprägt war und die Kurven mit zunehmenden x -Werten steiler abfielen (Abb. 9).

Die höchste Streuungsintensität zeigte ME-CD, unbeeinflusst durch einen AD-Zusatz oder vorheriges Autoklavieren. Eine deutlich geringere Intensität im Maximum ($s = 0,05$) resultierte bei ME-ION. Die differenzierten Streuungsintensitäten wurden vermutlich durch die qualitativ bzw. quantitativ unterschiedliche Zusammensetzung der Systeme ME-CD und ME-ION (Wasser/Öl-Verhältnisse: ME-CD = 13,2:1; ME-ION = 14,2:1) verursacht. Der unterschiedliche Tensid-Gehalt in ME-ION (15% im Gegensatz zu 20% in ME-CD) machte sich durch eine nur sehr geringe Links-Verschiebung des Peaks bemerkbar (Abb. 9).

Im Falle der GM dagegen konnte lediglich die geringe Links-Verschiebung aufgrund des ungleichen Tensid-Gehalts detektiert werden, wobei der Unterschied der Intensitätsmaxima ausblieb (Abb. 9, offene Kreise). Diese Beobachtungen deuten, ebenso wie der abweichende Kurvenverlauf der GM, darauf hin, dass die Kotenside HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD in

beiden ME-Systemen einen wichtigen Beitrag leisten zur ME-Bildung und im Vergleich zu den Solubilisaten (GM) vermutlich differenzierte Strukturen ausbilden.

Aus diesen Befunden lässt sich schlussfolgern, dass ME-CD und ME-ION typische ME-Strukturen aufweisen, wofür der charakteristische, auch in der Literatur beschriebene [94] Kurvenverlauf, spricht. Allerdings kann aus den bisherigen Untersuchungen nicht abgeleitet werden, ob die ME wasserkontinuierliche Systeme mit geschwollenen Mizellen oder mit bikontinuierlicher Struktur darstellen. Eine strukturelle Veränderung des Systems ME-CD durch Arzneistoffzusatz oder eine Dampfdruckbehandlung konnte mittels dieser Methode nicht festgestellt werden.

4.1.4 ARZNEISTOFF-WECHSELWIRKUNGEN

4.1.4.1 Verteilungskoeffizient

Die Polarität und das Verteilungsverhalten eines Arzneistoffs in den Formulierungskomponenten ist ein wichtiges Kriterium für die Bewertung der nachfolgenden Permeationsstudien (s. Kap. 4.2) und wird über den Verteilungskoeffizienten (VK) ermittelt. Der VK der beiden Substanzen AD und FSC (Tabelle 8) verdeutlicht deren ausgeprägte Lipo- bzw. Hydrophilie. Es wurde der Oktanol/Puffer(EBS)-VK (VK_{okt}) bestimmt und darüber hinaus in Anlehnung an die ME-Rezepturen der VK zwischen EBS-Puffer und IPM (VK_{ipm}) (s. Kap. 5.2.8).

Die Werte für VK_{okt} und VK_{ipm} unterscheiden sich dahingehend, dass die Oktanol-Werte für das lipophile AD durchweg höher und für das hydrophile FSC durchweg niedriger als die entsprechenden IPM-Werte ausfallen. Der jeweilige Charakter der Substanz bewirkt, dass sich das lipophile AD in höherer und das hydrophile FSC in niedrigerer Konzentration in Oktanol lösen als in IPM. Im Vergleich zu Oktanol stellt IPM aufgrund seiner Esterfunktion das weniger lipophile Medium dar.

Der Einfluss der verschiedenen Zusätze (Kotenside) zur wässrigen Phase ist daher erwartungsgemäß für AD weitaus deutlicher als für FSC. Im Falle des FSC führt lediglich der Zusatz von HP- γ -CD (9%) zu einem signifikanten Absinken der VK. Die Substanz wird in diesem Falle vermutlich aufgrund von Wechselwirkungen oder Inklusion durch das CD verstärkt in der wässrigen Phase gehalten. Der Effekt, den PG auf die FSC-Verteilung zwischen IPM und Pufferlösung ausübt, ist nicht eindeutig. Ein Anstieg des VK_{ipm} (s. Tabelle 8) bedeutet genau genommen eine größere Lipophilie der Testsubstanz. Denkbar wäre eine Anordnung der PG- und IPM-Moleküle in der Art, dass die Lipophilie der IPM-Phase

herabgesetzt wird und sich aufgrund dessen mehr FSC in die IPM-Phase verteilen kann. Für die nachfolgenden Untersuchungen kann aufgrund dieser Werte allerdings von einer nahezu vollständigen Verteilung des FSC in die wässrigen Bereiche der ME ausgegangen werden.

Tabelle 8: Verteilungskoeffizienten (VK) von Androstendion (AD) und Fluorescein-Na (FSC) mit verschiedenen Zusätzen

System	Test-substanz	Zusätze zur wässrigen Phase			
		ohne (Referenz)	PG (9%)	HP- γ -CD (9%)	HTAP- β -CD (9%)
Oktanol/EBS	AD	592,79 \pm 22,89	330,40 \pm 4,15*	3,18 \pm 0,016*	20,64 \pm 1,44*
	FSC	0,235 \pm 0,129	0,219 \pm 0,023	0,021 \pm 0,011	0,128 \pm 0,102
IPM/EBS	AD	149,66 \pm 0,72	80,80 \pm 6,6*	0,43 \pm 0,005*	0,81 \pm 0,05*
	FSC	0,806 \pm 0,012	1,294 \pm 0,028*	0,200 \pm 0,198*	0,831 \pm 0,089

n = 3; * = signifikant (p < 0,01) zum jeweiligen Wert ohne Zusatz

Im Falle von AD bewirken alle drei zum Puffer zugefügten Kotenside eine signifikante Reduzierung der VK sowohl gegen Oktanol als auch gegen IPM in der Reihenfolge PG << HTAP- β -CD < HP- γ -CD, was gleichbedeutend damit ist, dass mehr AD in der wässrigen Phase verbleibt. Während also ein Zusatz von PG lediglich eine leichte Tendenz zeigt, die Arzneistoffkonzentration in der wässrigen Phase zu erhöhen, ist dieser Effekt bei den beiden CD wesentlich stärker ausgeprägt, wobei auch hier HP- γ -CD den größten Einfluss hat. Es muss von einer Inklusion des AD in die CD-Kavität ausgegangen werden (vgl. Kap. 4.1.4.3), woraus eine höhere Konzentration in der wässrigen Phase resultiert.

Für die ME-Systeme lässt sich aufgrund dieses Verteilungsverhaltens diskutieren, dass die jeweiligen Kotenside möglicherweise den zusätzlichen Effekt haben, den Wirkstoff in den wässrigen Bereichen der Zubereitung zu halten, aus denen eine bevorzugte Freigabe erfolgen kann. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der Versuche zur Sättigungslöslichkeit von AD (s. folgendes Kap. 4.1.4.2). Für das AD-Freigabeverhalten könnte daher eine Reihenfolge von ME-CD > ME-ION > ME-PG erwartet werden.

4.1.4.2 Sättigungslöslichkeit

AD weist eine so geringe Wasserlöslichkeit auf, dass eine rein wässrige AD-Formulierung nicht in Betracht kommt. Durch Verwendung einer ME als Trägersystem ist eine deutliche Löslichkeitsverbesserung zu erwarten. Peltola et al. [98] konnten dies für das strukturverwandte Estradiol in unterschiedlichen ME-Systemen erreichen und in ihren Untersuchungen eine deutliche Steigerung des Estradiol-Fluxes durch Humanhaut nachweisen.

Abb. 10 stellt die ermittelten Sättigungslöslichkeiten (s. Kap. 5.2.9) für AD in den drei ME dar. Zum Vergleich sind zusätzlich die Werte für EBS (pH 7,4) und Wasser sowie für die wässrigen, 9%igen CD-Lösungen und IPM angegeben. Alle Hilfsstoffe und Formulierungen bewirkten einen signifikanten Anstieg der Löslichkeit gegenüber Wasser bzw. EBS.

Die CD-haltigen Systeme waren der CD-freien ME-PG beide signifikant überlegen, indem sie die doppelte (ME-ION) bzw. dreifache (ME-CD) AD-Konzentration in Lösung brachten. Die resultierende Reihenfolge ME-CD > ME-ION > ME-PG steht in guter Übereinstimmung mit den in Kap. 4.1.4.1 bestimmten AD-Verteilungskoeffizienten. Verglichen mit der reinen IPM-Lösung ergab ME-CD eine signifikant höhere Löslichkeit für AD, während ME-ION keine Verbesserung und ME-PG eine signifikante Verschlechterung bewirkte. Gegenüber den entsprechenden wässrigen Kotensid-Lösungen (HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD) konnten ME-CD und ME-ION ebenfalls signifikant mehr Arzneistoff in Lösung bringen. Die Sättigungslöslichkeit für AD in einer 10%igen, wässrigen CrEL-Lösung wurde von Berndt [74] zu 0,9 mg/ml bestimmt. Im Gegensatz dazu war durch alle hier getesteten Formulierungen bzw. Einzelsubstanzen eine deutliche, 5-15fache Löslichkeitsverbesserung für AD zu erreichen.

Die AD-Löslichkeit in den ME ist demzufolge nicht allein auf den Gehalt an IPM bzw. CrEL (vgl. Tabelle 4) zurückzuführen, sondern es ist anzunehmen, dass die enthaltenen CD sowohl durch Bildung von AD-Einschlusskomplexen in der wässrigen Region als auch durch Co-Solubilisierung mit dem Tensid einen steigernden Effekt auf die AD-Löslichkeit ausübten. Diese Beobachtungen korrelieren ebenfalls mit den Ergebnissen der VK-Bestimmungen (vgl. Kap. 4.1.4.1).

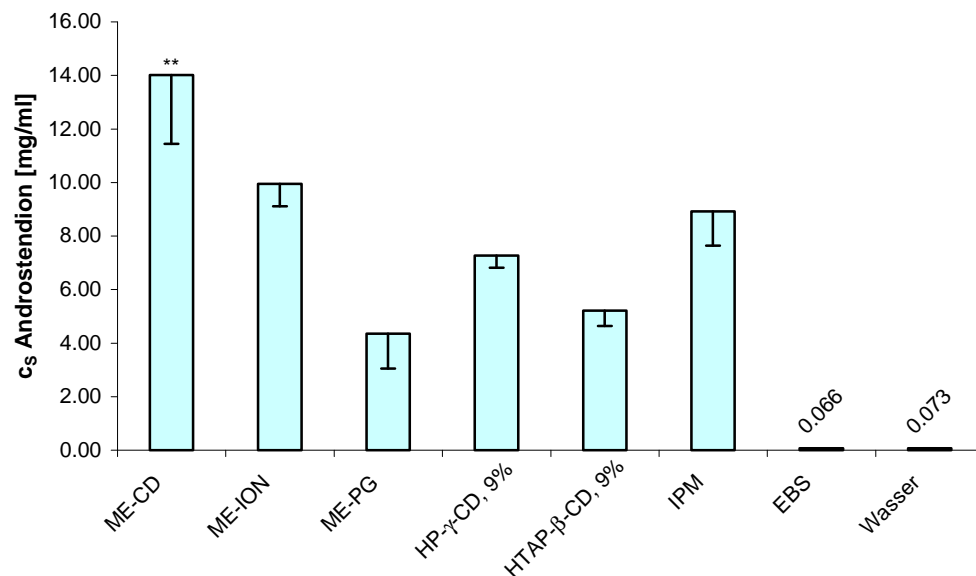


Abb. 10: Sättigungslöslichkeiten (c_s) von AD in verschiedenen Formulierungen sowie in IPM, Wasser und EBS ($25^\circ\text{C} \pm 0,5$); \pm SD; ** = signifikant ($p < 0,01$); $n = 4$

Die wässrigen CD-Lösungen sowie auch IPM erhöhten die Sättigungslöslichkeit des AD über den Wert von ME-PG (HP- γ -CD bzw. IPM signifikant) hinaus, so dass die CD-freie ME aus Sicht der Löslichkeitsverbesserung als weniger geeignet zu beurteilen ist. ME-CD und ME-ION bieten dagegen hervorragende Lösungseigenschaften für den lipophilen Arzneistoff AD.

Bei nasaler Applikation mittels Dosierspray wird mit einem Sprühstoß ein Volumen von ca. 50 μl verabreicht. Bei einer akzeptablen Dosierung von 3 x täglich 2 Sprühstößen könnte mit ME-CD als potentiellm Trägersystem eine therapeutische Dosis von ~4 mg/d AD (50 μl enthalten 0,7 mg AD) erreicht werden. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass die Zubereitung eine ausreichende Stabilität aufweisen und der Arzneistoff über einen längeren Zeitraum vollständig in Lösung verbleiben muss. Eine Zubereitung an der Grenze der Sättigungslöslichkeit wird diesen Anforderungen nicht genügen können.

Für die lokale Anwendung am Auge sind vermutlich deutlich geringere AD-Konzentrationen erforderlich [99], so dass hier alle Systeme ein ausreichendes Lösungsvermögen für AD aufweisen dürften und andere Parameter, wie beispielsweise die physiologische Verträglichkeit, im Vordergrund stehen.

4.1.4.3 Cyclodextrin-Einschluss des AD

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Um zu prüfen, ob eine Einschlussverbindung von AD in HTAP- β -CD entsteht, wurden DSC-Messungen (vgl. auch Kap. 4.1.3.3) im Scanning-Betrieb durchgeführt (s. Kap. 5.2.6). Zwischen HP- γ -CD und AD wurde bereits von Berndt [74] die Bildung einer Inklusion u. a. auch mit dieser Methode nachgewiesen.

Kontinuierliches Erhitzen einer reinen, kristallinen Substanz führt bei Erreichen ihres Schmelzpunktes zu einem endothermen Schmelzpeak. Wird eine physikalische Mischung aus zwei oder mehreren Bestandteilen erhitzt, so sind in der Regel die Schmelzpeaks der Einzelkomponenten zu detektieren, wohingegen bei Vorliegen einer Inklusion oder eines Komplexes die entsprechenden Peaks nicht mehr erscheinen dürften [100], was allerdings abhängig ist von der Konzentration der Reaktanten. Damit kann ein Vergleich entsprechender Thermogramme auch zum Nachweis einer Komplexbildung mit CD herangezogen werden [101].

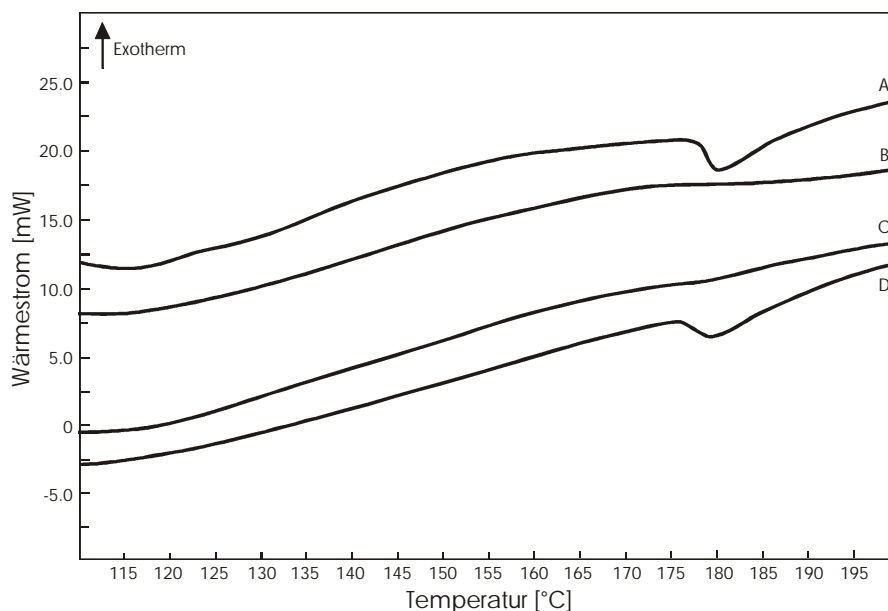


Abb. 11: DSC-Thermogramm: (A) AD, (B) HTAP-b-CD, (C) AD/HTAP-b-CD-Lyophilisat, (D) physikalische Mischung aus AD und HTAP-b-CD

In Abb. 11 ist der relevante Temperaturbereich um den Schmelzpeak des AD (vgl. Kurve A, $T_{\text{on}} = 178\text{ °C}$) gezeigt. HTAP- β -CD (Kurve B) weist im untersuchten Bereich keine Peaks auf,

so dass bei einer physikalischen Mischung aus beiden Komponenten nur der AD-Peak zu detektieren ist (Kurve D). Der Peak in Kurve D erscheint etwas schwächer aufgrund einer Überlagerung beider Kurven und einer nicht ganz auszuschließenden partiellen Ausbildung von Einschlusskomplexen, bedingt durch die intensive mechanische Verreibung beider Stoffe während der Herstellung der Testmischung. Konzentrationsbedingte Unterschiede können ausgeschlossen werden, da in allen Messungen die gleiche Einwaage an AD (5 mg) verwendet wurde.

Bei Vermessen des Lyophilisats aus AD und HTAP- β -CD ist der AD-Peak nicht mehr zu detektieren (Kurve C), so dass ein Einschlusskomplex beider Substanzen anzunehmen ist. Diese Messungen stehen in guter Übereinstimmung mit dem von Berndt [74] für das HP- γ -CD erzielte Resultat. Die im Lyophilisat gefundene Komplexbildung war weiterhin im Hinblick auf die relevanten Formulierungen auch für die AD/CD-Lösung zu überprüfen.

Löslichkeitsmethode

Die Einschlusskomplexbildung zwischen AD und den beiden getesteten CD wurde mit der Löslichkeitsmethode näher charakterisiert (s. Kap. 5.2.9), und die Komplexbildungskonstanten wurden bestimmt.

Abb. 12 zeigt die ermittelten Löslichkeitsisothermen für HP- γ -CD und HTAP- β -CD in Gegenwart von AD. In beiden Fällen resultieren Geraden mit $R^2 > 0,99$. Somit handelt es sich in diesem Konzentrationsbereich um Löslichkeitsdiagramme vom A_L -Typ, die sich durch einen linearen Löslichkeitsanstieg auszeichnen.

Unter Annahme eines 1:1-Komplexes wurden die apparenten Komplexstabilitätskonstanten K_{stab} nach der Formel von Higuchi und Connors [102] berechnet:

$$K_{stab} = \frac{\tan a}{c_s \cdot (1 - \tan a)}$$

wobei $\tan a$ die Steigung der Löslichkeitsisotherme und c_s die Sättigungslöslichkeit des Arzneistoffs in Wasser angibt.

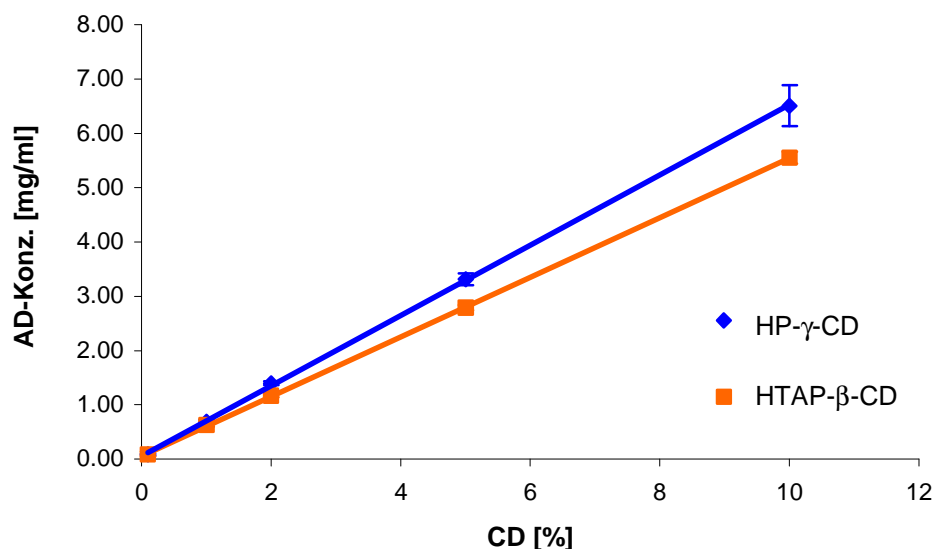


Abb. 12: Löslichkeitsisothermen von AD in Gegenwart von HP-g-CD bzw. HTAP-b-CD bei 25 °C; \pm SD; $n = 4$

Dabei ist zu berücksichtigen, dass Wechselwirkungen des Arzneistoffs, beispielsweise mit der CD-Außenhülle, oder anders geartete Assoziatbildungen nicht einbezogen werden. Man spricht daher von der apparenten oder virtuellen Komplexstabilitätskonstante.

Bei molarer Auftragung errechnen sich die apparenten Stabilitätskonstanten K_{stab} zu den in Tabelle 9 aufgelisteten Werten.

Tabelle 9: Rel. Molmasse (M_{rel}), Geradenanstieg ($\tan a$) bei molarer Auftragung und K_{stab} für Androstendion-Komplexe mit HP-g-CD und HTAP-b-CD

CD	M_{rel}	$\tan a$	K_{stab} [1/mol]
HP-g-CD	1355	0,330	1932
HTAP-b-CD	1670	0,324	1882

Für den AD-Einschluss durch HP-g-CD wurde bereits von Berndt [74] die K_{stab} bestimmt und ein Wert von 947,6 gefunden. Da die von Berndt [74] ermittelte Löslichkeitsisotherme jedoch einen identischen Verlauf zu der hier detektierten (Abb. 12) zeigte, ist die Ursache für die Diskrepanz unklar. Eine Nach-Berechnung von K_{stab} anhand der oben beschriebenen Formel

aus der von Berndt [74] abgebildeten Löslichkeitsisothermen ergab mit 1892 nahezu den gleichen Wert, der hier gefunden wurde (Tabelle 9).

Albers und Müller [103] untersuchten die Löslichkeit von TST unter Zusatz von HP- β -CD und gelangten zu vergleichbaren Werten. Gute Übereinstimmung besteht auch mit den K_{stab} strukturverwandter Substanzen [60]. In Anlehnung an weitere Literaturdaten [104, 105, 106], die sich auf Komplexe zwischen β -CD-Derivaten und Steroiden beziehen, wird für HTAP- β -CD und AD ein 1:1-Komplex angenommen, wohingegen für γ -CD möglicherweise auch Komplexe im Verhältnis 1:2 oder 2:1 in Betracht kommen, wie sie beispielsweise für das Antiallergikum Tranilast beschrieben wurden [107].

4.2 Permeationsstudien

4.2.1 EINFÜHRUNG

Um an ihren Wirkort zu gelangen, müssen viele Arzneistoffe zuvor eine Membran durchdringen, wie beispielsweise die Haut, die Darmwand oder die Nasenschleimhaut. Aber auch bei lokaler Therapie stellt der Permeationskoeffizient des applizierten Arzneistoffs ein wichtiges Bewertungskriterium für die Substanz bzw. für die Zubereitung dar. In dieser Arbeit sollten die beiden unterschiedlichen Barrieren Nasenschleimhaut und Hornhaut des Auges hinsichtlich ihrer Permeabilität verglichen und der Einfluss der Zubereitungen bzw. ihrer Bestandteile auf die Permeation der Testsubstanzen bewertet werden.

Die beiden Gewebe lassen schon allein aufgrund ihrer Dicke eine unterschiedliche Permeabilität erwarten (vgl. Tabelle 2 und 3). Hinzu kommt der sandwichartige Aufbau der Kornea aus abwechselnd hydro- und lipophilen Schichten (vgl. Kap. 3.1.1), der die meisten Substanzen, wenn überhaupt, nur zu einem sehr geringen Teil permeieren lässt. Darüber hinaus hat das korneale Epithel die Aufgabe, einerseits ein Eindringen von Wasser und Elektrolyten in das Augennere sowie andererseits einen Austritt von physiologischen Substanzen zu unterbinden und somit die Homöostase aufrecht zu erhalten [20, 44]. Das Kornea-Epithel ist daher vergleichsweise noch schlechter durchlässig als andere Epithelien.

Ein aussagekräftiges Kriterium für das zu erwartende korneale Permeationsverhalten einer Substanz stellt deren Verteilungskoeffizient dar, der in einem Bereich von 100 – 1000 (gemessen für Oktanol/ Wasser) optimale Durchtrittsraten erwarten lässt [16, 27, 47]. Für die hydrophileren Substanzen repräsentiert das lipophile Epithel die geschwindigkeits-

bestimmende Barriere [20]. Lipophile Stoffe können dagegen nur langsam in das wässrige Stroma eindringen [108]. Im Gegensatz dazu ist die Nasenmukosa einheitlich zusammengesetzt (vgl. Kap. 3.2.1) und stellt im Allgemeinen eine eher schwache Barriere mit guten Resorptionseigenschaften für viele Arzneistoffe dar [32]. Dabei spielt der hydro- oder lipophile Charakter der Substanz eher eine untergeordnete Rolle [48], und Merkmalen wie Molekülgröße und Struktur kommt mehr Bedeutung zu [32, 109].

Aufgrund dieser Membranunterschiede ist zu vermuten, dass verschieden zusammengesetzte Trägerformulierungen individuell Einfluss nehmen können auf das Permeationsverhalten einer Substanz an der jeweiligen Membran. Des Weiteren ist unter dem Aspekt, dass okular applizierte Arzneistoffe über den Tränen-Nasen-Kanal rasch die Nasenschleimhaut erreichen und dort systemisch resorbiert werden können [110], ein Vergleich der Permeabilitäten beider Gewebe von Interesse.

Die Permeationsstudien wurden *in vitro* mit biologischem Gewebe von Schlachttieren durchgeführt, das in der Regel kostengünstig und unproblematisch beschafft werden kann. Kornea von Schweinen dient in der Literatur in zahlreichen Untersuchungen als Permeationsbarriere [106, 111 - 115] und wurde aufgrund der Ähnlichkeit von Anatomie und Physiologie zur menschlichen Hornhaut ausgewählt. Daneben kam Nasenmukosa vom Rind zum Einsatz, da auch hierfür bereits umfangreiche Literaturdaten [74, 116 - 119] vorlagen und die Präparation der Gewebestücke und Mukosa für diese Tierart in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war [74]. Seit kurzem stehen jedoch auch Daten über Nasenmukosa vom Schwein als Permeationsbarriere in der Literatur zur Verfügung [120 - 122]. Darüber hinaus findet korneales Gewebe von Kaninchen [z.B. 44, 123 - 125] in der Forschung seit langem weit verbreitete Anwendung und gelangt, ebenso wie Nasenmukosa von Kaninchen [43, 53, 126, 127], Schafen oder Hunden [117] zum Einsatz bei *In-vitro*-Permeationsstudien.

Um darüber hinaus membranunabhängige Vergleichswerte für das Permeationsverhalten der Substanzen aus den unterschiedlichen Zubereitungen zu erhalten, wurden die Versuche in gleicher Art und Weise mit einer synthetischen Membran aus regenerierter Cellulose (Nephrophan[®]) mit einem Porendurchmesser von 2,4 nm und einer Dicke von 14-15 µm durchgeführt.

Als Testsubstanzen gelangten das stark lipophile AD sowie das sehr hydrophile FSC zur Auswahl (s. Kap. 3.4.1 und 3.4.2). FSC wird oft als Marker-Substanz bei der Durchführung von Permeationsstudien eingesetzt und kann Auskunft geben über die Integrität der Membran sowie die Funktionsweise des verwendeten Permeationsmodells [52 - 54]. AD stellt einen potentiellen Arzneistoff dar, der sowohl nasal bzw. systemisch [11] als auch

okular [9, 10] Anwendung finden kann und für den die ME-Systeme mögliche Trägerformulierungen in einem Arzneimittel repräsentieren können.

4.2.2 THEORETISCHER HINTERGRUND

Die Permeation beschreibt den Stoffdurchgang einer Substanz durch eine Barriere, die ein Donorkompartiment von einem Akzeptorkompartiment trennt. Zu Beginn ist der Stoff vollständig im Donor gelöst, und im Akzeptor befindet sich das reine Lösungsmittel. Die Substanz beginnt im Verlaufe des Versuchs, durch die Barriere hindurch in die Akzeptorphase zu diffundieren. Dabei ist es für die Erhaltung des Flux in Akzeptorrichtung wichtig, die Konzentration im Akzeptorkompartiment möglichst niedrig zu halten, so dass Sink-Bedingungen gegeben sind (< 10% der Sättigungslöslichkeit).

Nach einer bestimmten Zeit (Lag-time, s.u.!) hat sich in der Barriere ein konstantes Konzentrationsgefälle gebildet, das ein zeitunabhängiges Verhältnis der Donor- und Akzeptorkonzentration zur Folge hat [91]. Das System befindet sich dann im Fließgleichgewicht oder Steady-state. Wenn weiterhin gegeben ist, dass die ruhenden Schichten an den Grenzflächen der Barriere keinen wesentlichen Einfluss auf die Permeation haben und die Übergangswiderstände klein sind [91], kann der *Permeabilitätskoeffizient* P_{eff} einer Substanz durch eine Membran nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$P_{\text{eff}} = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{V}{A \cdot c_0 \cdot 60}$$

Hierbei bedeuten dc/dt die Konzentrationsänderung im Akzeptorkompartiment über die Zeit, was gleichbedeutend ist mit der Steigung einer aus der Konzentration über die Zeit aufgetragenen Geraden. V steht für das Akzeptorvolumen, A für die Fläche der Barriere und c_0 für die Ausgangskonzentration im Donator. Der Faktor 60 ergibt sich aus der Umrechnung der üblicherweise in Minuten angegebenen Versuchszeit in Sekunden, da die gängige Einheit des Permeationskoeffizienten cm/s ist.

Der Steady-state-Zustand muss nicht von Beginn an herrschen. Es kann sich vielmehr erst nach einer Verzögerungszeit, die benötigt wird, um einen einheitlichen Konzentrationsgradienten in der Barriere aufzubauen, ein Fließgleichgewicht einstellen. Diese Zeit ergibt sich aus der Extrapolation des linearen Teils der Geraden aus Konzentration über Zeit auf die x-Achse und wird auch als Lag-time bezeichnet. Die Lag-time ist proportional zum Quadrat der Barrierendicke und damit stark abhängig von dieser Größe.

4.2.3 **ERGEBNISSE**

Die Permeationsstudien wurden durchgeführt mit in der Arbeitsgruppe entwickelten [128] und weiter modifizierten Ussing-Kammern. Besonderes Augenmerk war dabei auf die unterschiedlichen Membran-Beschaffenheiten zu legen, die ein Aufrechterhalten der Wölbung im Falle der Kornea und ein ausreichendes Abdichten der Kammer mit der dünnen Mukosa erforderten. Diesen Anforderungen wurde durch zwei unterschiedliche Methoden, die Membran zu fixieren, Rechnung getragen (s. Kap. 5.2.10). Alle versuchsrelevanten Parameter der Kammern, wie Kammervolumina und Permeationsfläche, blieben jedoch gleich.

Die jeweiligen Permeationskoeffizienten (P_{eff}) konnten nur dann berechnet werden (s. Kap. 4.2.2), wenn folgende Voraussetzungen für die Versuchsreihe gegeben waren:

1. Pro Einzelversuch (d.h. pro Kammer) konnten mindestens zu den drei letzten Probeentnahmezeiten von 0 verschiedene Konzentrationen bestimmt werden.
2. Die gemessenen Werte standen bei Auftragung über die Zeit in einem linearen Zusammenhang ($R^2 > 0,95$).
3. Die Ergebnisse jeder einzelnen Kammer einer Versuchsreihe ($n = 5-23$) entsprachen mindestens diesen genannten Voraussetzungen.

Vor allem für die verhältnismäßig dicke Kornea ergab sich in mehreren Fällen eine ausgedehnte Lag-time, so dass teilweise erst zur vorletzten oder letzten Entnahmezeit Substanz im Akzeptor detektiert werden konnte. Für diese Versuchsreihen konnte daher kein P_{eff} berechnet werden, so dass für eine Interpretation und Einordnung der Daten mit den über die Gesamtversuchszeit (90 bzw. 300 min) kumulierten Substanzmengen Q gearbeitet wurde.

4.2.3.1 Androstendion

Für einen Vergleich aller drei Membranen (Schweinekornea, Rindernasenumukosa, Nephrophan®) wurde der P_{eff} für AD jeweils aus EBS-Puffer-Lösung sowie aus den ME-Zubereitungen ME-CD und ME-PG bestimmt. Um weiterhin den Einfluss der Einzelbestandteile der ME auf die AD-Permeation zu ermitteln, erfolgte deren Zugabe zur AD/EBS-Lösung im Donatorkompartiment. In weiteren Experimenten wurde die jeweilige Membran mit einer arzneistofffreien Pufferlösung der entsprechenden Testsubstanz vorinkubiert (vgl. Kap. 5.2.10). Um deren Einfluss auf die Membranintegrität zu prüfen, wurde anschließend AD aus EBS durch diese vorbehandelte Membran permeiert. Für alle Testzubereitungen lag die AD-Konzentration einheitlich bei 25 µg/ml ($0,087 \cdot 10^{-6}$ Mol/ml).

Für die Kornea ergab sich bereits bei der Permeation von AD aus EBS eine Lag-time, die bei den anderen Geweben teilweise erst nach Hinzufügen eines Adjuvans auftrat. Die jeweiligen Verzögerungszeiten sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 10 ff.) unter dem zugehörigen P_{eff} -Wert aufgeführt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass für die Versuchsreihen, für die kein P_{eff} bestimmt werden konnte (s. oben!), folglich auch keine Lag-time zu berechnen war. Werte für die Lag-time, die unterhalb der ersten Probenahmezeit lagen, sind nicht angegeben.

4.2.3.1.1 Untersuchungen mit HP- γ -CD

Erwartungsgemäß unterschieden sich die P_{eff} von AD für Kornea und Mukosa deutlich. In Tabelle 10 sind die ermittelten P_{eff} für AD aus EBS sowie unter Einfluss von HP- γ -CD dokumentiert.

Die Versuche mit Nephrophan[®] wurden sowohl in den Kammern für Mukosa mit den entsprechenden Probenahmezeiten (s. Kap. 5.2.10) als auch im Kornea-Modell mit den größeren Probezeitintervallen und der längeren Versuchsgesamtdauer durchgeführt. Beim Vergleich der resultierenden P_{eff} aus den 90 min- und 300 min-Versuchen unter Zusatz von 9% HP- γ -CD ergab sich für die Messreihen ein statistisch signifikanter Unterschied, so dass die Nephrophan[®]-Ergebnisse im Folgenden den Versuchszeiten entsprechend aufgeführt werden. Als mögliche Ursache für den Unterschied der HP- γ -CD-Werte kann eine anfängliche Retardierung der AD-Permeation, die jedoch keine Lag-time ergab, aufgrund von Assoziat- oder Schichtbildung der HP- γ -CD-Moleküle auf der Membran in Betracht gezogen werden. Die aus den Versuchen resultierenden Geraden unterschieden sich daher aufgrund der unterschiedlichen Gesamtversuchszeiten bzw. Probenahmeintervalle in ihren Steigungen. In ME-CD (Tabelle 12) kam dieser Effekt aufgrund von Wechselwirkungen bzw. Konkurrenz der Einzelkomponenten mit der CD-Kavität nicht zum Ausdruck.

Für die Permeation aus EBS-Lösung ergibt sich ein annäherndes Verhältnis der Werte Mukosa : Kornea : Nephrophan[®] von 3 : 1 : 4, was bereits die relativ gute Permeabilität der Mukosa erkennen lässt. Allerdings bleibt dieses Verhältnis für die weiteren Versuche nicht in jedem Fall bestehen.

Tabelle 10: P_{eff} und Lag-time für AD (25 µg/ml) aus EBS und Formulierungen mit HP- γ -CD

Formulierung	P_{eff} [$10^{-5} \cdot \text{cm/s}$] ^a			
	Lag-time [min] ^a			
	Mukosa	Kornea	Nephrophan®	
			90 min	300 min
EBS	2,19 ± 0,78	0,73 ± 0,15	2,82 ± 0,58	3,09 ± 0,84
	Ø	44,9 ± 23,0	Ø	Ø
HP- γ -CD (1:1)	2,02 ± 1,34	0,88 ± 0,14 *	3,30 ± 0,79	3,00 ± 0,36
	Ø	66,5 ± 16,3	Ø	Ø
HP- γ -CD (1:2)	2,01 ± 0,42	0,91 ± 0,10 **	3,32 ± 0,20	3,45 ± 0,21
	Ø	69,2 ± 19,1	Ø	Ø
HP- γ -CD 9%	1,31 ± 0,84	nicht berechenbar	0,93 ± 0,05 **	1,15 ± 0,12 **
	Ø	nicht berechenbar	Ø	Ø
HP- γ -CD vi	1,58 ± 0,43	0,50 ± 0,08 **	2,82 ± 0,73	nicht durchgeführt
	Ø	63,9 ± 12,2	Ø	

^a ± SD, n = 5; vi = vorinkubiert

* signifikant (* p < 0,05; ** p < 0,01) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Um die kumulierte Arzneistoffgesamtmenge nach Permeation durch Mukosa und Kornea vergleichen zu können, wurde eine Versuchsreihe mit AD/EBS durch Kornea über 90 min mit den analogen Entnahmezeiten der Mukosa-Studien durchgeführt. Es resultierte nach Versuchsende für die Kornea ein Q_{90} -Wert von $0,89\% \pm 0,42$ und für die Mukosa von $6,23\% \pm 2,68$ bezogen auf eine jeweilige Ausgangskonzentration von 25 µg/ml AD. Bei gleichen Versuchsbedingungen beträgt demnach die Permeationsrate nach 90 min für die Kornea lediglich ein Siebtel der AD-Menge, die in der gleichen Zeit durch Mukosa permeiert. P_{eff} ($0,64 \pm 0,32 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$) und Lag-time ($43,3 \pm 2,6 \text{ min}$) durch Kornea nach 90 min unterschieden sich dagegen nicht von den Werten, die nach 300 min erhalten wurden (vgl. Tabelle 10).

Der Zusatz von HP- γ -CD in einem molaren Verhältnis zu AD von 1:1 (entsprechend 0,012% CD) und 1:2 (entsprechend 0,024% CD) führte im Fall der Kornea zu einem signifi-

kanten Anstieg der P_{eff} . Bei den beiden anderen Barrieren war der Unterschied statistisch nicht relevant. Addition von 9% HP- γ -CD (entsprechend einem molaren AD/CD-Verhältnis von 1:764) hingegen, was der Konzentration in der ME-Komposition (ME-CD) entspricht, führte mit Ausnahme der Mukosa zum signifikanten Absinken der Permeabilitätskoeffizienten.

In der Literatur wird von maximalen Permeationsraten in Gegenwart von CD berichtet, wenn diese Hilfsstoffe lediglich in Konzentrationen zugegeben werden, die gerade zum vollständigen Auflösen des Arzneistoffs erforderlich sind [105, 106, 129], was einer maximalen CD-Zugabe entsprechend dem molaren Verhältnis des gebildeten Einschluss-Komplexes gleichzusetzen ist. Bei Überschreiten dieses Verhältnisses wird der Anteil an komplexiertem Arzneistoff aufgrund der erhöhten CD-Konzentration angehoben. Damit liegt weniger diffusionsfähiger unkomplexierter Arzneistoff vor und die Verfügbarkeit der Substanz wird abgesenkt [16, 130].

Die Ergebnisse der Versuche mit der hohen HP- γ -CD-Konzentration von 9% sind sicher im Einklang mit diesen Literaturdaten zu interpretieren. Andererseits macht der Vergleich der CD-beeinflussten Permeabilitäten der verschiedenen Gewebe deutlich, dass lediglich für die Kornea mit geringer CD-Konzentration (1:1 und 1:2, s. Tabelle 10) ein positiver Effekt erzielt werden konnte, was letztlich für eine gewisse Spezifität der Gewebe spricht und Verallgemeinerungen erschwert.

Wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben, besitzt das Epithel der Kornea eine fest anhaftende Glykokalix, die unter physiologischen Bedingungen die Mukusschicht des Tränenfilms „befestigt“ und der Epithel-Oberfläche einen hydrophilen Charakter verleiht [22]. Aufgrund ihrer Verankerung in der Zellmembran wird vermutet, dass die Glykokalix und damit die oberflächliche Hydrophilisierung des Epithels während der durchgeführten Experimente erhalten bleibt. Das zur Molekülaußenseite hin hydrophile CD kann somit als Carrier für das inkludierte lipophile AD fungieren und seine Konzentration am Epithel deutlich steigern, wie es auch für andere Gastmoleküle gefunden wurde [16]. Im Falle der Mukosa dagegen kann das AD direkt in die nach außen lipophilen Epithelzellen penetrieren, und bei der Nephrophan®-Membran erfolgt eine Porendiffusion, wobei in beiden Fällen keine permeationsfördernde Wirkung des CD zu erwarten ist.

Um einen direkten Einfluss des CDs auf die Membranintegrität zu erfassen, wurden die Gewebe mit einer 9%igen HP- γ -CD Lösung vorinkubiert (s. Kap. 5.2.10) und anschließend die Permeationsrate von AD aus EBS bestimmt. Lediglich bei der Kornea zeigte sich ein signifikanter Effekt mit einer wider Erwarten reduzierten Permeabilität. Als mögliche

Erklärung dafür bietet sich an, dass bei der Vorinkubation CD-Moleküle durch Wechselwirkungen mit der Glykokalix oder mit Mukusresten an der Epitheloberfläche fixiert werden. Ein nachfolgendes Eindringen des AD in die Membran könnte dann durch Interaktionen mit diesen CD-Molekülen behindert sein, was sich zudem in einer erhöhten Lag-time widerspiegelte (vgl. Tabelle 10). Bei einer Membranschädigung wäre dagegen ein signifikanter Anstieg der Permeabilität zu erwarten [125, 131], hervorgerufen durch die potentielle Fähigkeit der CD, Membranbestandteile, wie Phospholipide und Cholesterol, zu extrahieren [132]. In der Literatur werden viele CD im Allgemeinen als gut membranverträglich beschrieben [6, 59, 133, 134]. Für HP- γ -CD werden seine Fähigkeit, Cholesterol zu solubilisieren sowie seine hämolytische Aktivität als gering eingestuft [6].

Bemerkenswert bei den Kornea-Resultaten (vgl. Tabelle 10) ist, dass auch in den Versuchsreihen mit den molaren AD/CD-Verhältnissen (1:1 bzw. 1:2 AD/HP- γ -CD) bei signifikant erhöhten P_{eff} die Lag-time verlängert war. Diese Ergebnisse könnten ein weiterer Hinweis auf die oben diskutierte Carrier-Funktion des CDs sein. Einerseits wird die Verweildauer und Konzentration des AD an der „hydrophilisierten“ Membran (s. oben!) durch die Komplexbildung mit dem CD erhöht, andererseits jedoch muss die Substanz vor einer Penetration in das Kornea-Epithel zuerst aus der CD-Kavität diffundieren. Einen ähnlichen Mechanismus beschreiben Kristinsson et al. [135] für Co-Komplexe aus CD und lipophilem Arzneistoff mit Hydroxypropylmethylcellulose.

Die Vorinkubation von Nephrophan[®] diente der Beweisführung hinsichtlich des vollständigen Ausspülens der CD-Lösung aus der Kammer bzw. von der Membranoberfläche und führte erwartungsgemäß zum gleichen P_{eff} -Wert wie bei der Referenz mit EBS ohne Vorbehandlung (s. Tabelle 10).

4.2.3.1.2 Untersuchungen mit Cremophor[®] EL

Tabelle 11 zeigt die P_{eff} -Werte unter Einwirkung von CrEL, wobei, wie auch in allen weiteren Tabellen zu den Permeationsstudien, als Bezugsgröße die EBS-Werte aus Tabelle 10 wiederholt sind. Bei Zugabe von 20% CrEL zur AD-Lösung wurden alle Permeationskoeffizienten hoch signifikant reduziert. Für Kornea und Nephrophan[®] (90 min) ließ sich aufgrund der großen Lag-time kein P_{eff} -Wert und damit auch kein Wert für die Lag-time berechnen. Für die Mukosa bewirkte der Zusatz von CrEL die einzige signifikante Reduzierung des P_{eff} .

Es ist davon auszugehen, dass der lipophile Arzneistoff von dem Tensid CrEL durch Mizelleinschluss solubilisiert [74] und in den Mizellen relativ fest fixiert wird (CMC von CrEL,

20%ig in Wasser < 0,1%). Eine Gegenüberstellung zu den mit 9% HP- γ -CD erhaltenen P_{eff} -Werten (vgl. Tabelle 10) verdeutlicht für alle drei Membranen eine weitere Reduzierung, die im Falle von Nephrophan[®] statistisch signifikant ist. Offenbar ist der Mizelleinschluss des Arzneistoffs stabiler als der CD-Einschlusskomplex.

Tabelle 11: P_{eff} und Lag-time für AD (25 $\mu\text{g/ml}$) aus EBS und mit CrEL-Zusatz

Formulierung	P_{eff} [$10^{-5} \cdot \text{cm/s}$] ^a			
	Lag-time [min] ^a			
	Mukosa	Kornea	Nephrophan [®]	
			90 min	300 min
EBS	2,19 \pm 0,78	0,73 \pm 0,15	2,82 \pm 0,58	3,09 \pm 0,84
	Ø	44,9 \pm 23,0	Ø	Ø
CrEL 20%	0,50 \pm 0,11 **	nicht berechenbar	nicht berechenbar	0,15 \pm 0,03 **
	Ø	nicht berechenbar	nicht berechenbar	Ø
CrEL vi	1,61 \pm 0,59	0,55 \pm 0,12 *	3,31 \pm 0,68	
	Ø	78,3 \pm 20,9	Ø	nicht ermittelt

^a \pm SD, n = 5; vi = vorinkubiert

* signifikant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Eine Vorinkubierung der Gewebe mit einer 20%igen CrEL/EBS-Lösung hatte wiederum allein für die Permeabilität der Kornea eine signifikante Reduzierung zur Folge. Viele Tenside weisen eine permeationsfördernde Wirkung auf, die darauf beruht, dass die Tensidmoleküle partiell in die Membran eingelagert werden und bei steigender Konzentration Lipide herauslösen bzw. solubilisieren können [136]. Darüber hinaus wird für einige Tenside auch eine direkte Wirkung auf die Tight-junctions diskutiert [136]. Für CrEL kann unter den Versuchsbedingungen angenommen werden, dass kein membranschädigender Effekt auf die biologischen Membranen ausgeübt wird, da ansonsten eine erhöhte Permeationsrate die Folge sein müsste. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Berndt [74]. Bei den Daten für die Kornea fällt wiederum eine signifikante Verlängerung der Lag-time auf, die in diesem Fall mit einer Belegung der Membranoberfläche mit Tensid-Molekülen begründet werden kann. Die Cellulosemembran wurde ebenfalls vorinkubiert, um sicher zu gehen, dass keine in der Kammer verbleibenden Reste der Tensidlösung die nachfolgende Permeation

beeinflussen, sondern quantitativ ausgespült werden, was durch den von der Referenz nicht verschiedenen P_{eff} bestätigt wurde.

4.2.3.1.3 Untersuchungen mit den Mikroemulsionen ME-PG und ME-CD

Im Hinblick auf eine potentielle Anwendung als Arzneistoffträgersysteme war eine Untersuchung der AD-Permeation aus den beiden Zubereitungen ME-PG und ME-CD (Zusammensetzung vgl. 4.1.2) von besonderem Interesse. Beide ME bewirkten ein Absinken des P_{eff} (Tabelle 12), was aber nur bei der Kornea und Nephrophan[®] signifikant und im Fall von ME-PG jeweils stärker ausgeprägt war. De facto erfolgte aus ME-PG durch Nephrophan[®] bis zu 300 min überhaupt keine Diffusion, und für die Kornea war für ME-CD bzw. ME-PG erst nach 240 bzw. 300 min eine sehr geringe AD-Konzentration zu detektieren, so dass sich weder P_{eff} noch Lag-time berechnen ließen (vgl. Tabelle 12).

Es ist zu vermuten, dass bei diesen heterogenen Mehrkomponentensystemen der Verteilungskoeffizient des AD in der Formulierung sowie zwischen Trägersystem und Membran eine wesentliche Rolle spielt und das CD dabei einen entscheidenden Einfluss ausübt. Wie unter Kap. 4.1.4.1 beschrieben, bewirkte ein HP- γ -CDZusatz zur wässrigen AD-Lösung eine Reduzierung des VK_{ipm} von 149,66 auf 0,43, wohingegen PG lediglich auf einen Wert von 80,80 reduzierte. In der ME mit HP- γ -CD kann das AD durch Einschluss in die CD-Kavität vermutlich in den wässrigen Bereichen des Systems gehalten werden, aus denen die Penetration in die Barriere möglich ist. Ohne CD wird sich der lipophile Wirkstoff vorrangig zu den lipophilen Bereichen der ME orientieren und aufgrund seines relativ hohen VK_{ipm} wenig Tendenz zeigen, in die wässrigen Regionen und von dort in die Membran zu diffundieren. Für eine Wechselwirkung des HP- γ -CD mit AD im ME-System spricht auch die deutlich höhere Sättigungslöslichkeit von AD in ME-CD im Vergleich zu ME-PG (s. Kap. 4.1.4.2).

Tabelle 12: P_{eff} und Lag-time für AD (25 µg/ml) aus EBS, ME-PG und ME-CD

Formulierung	$P_{\text{eff}} [10^{-5} \cdot \text{cm/s}]^a$			
	<i>Lag-time [min]^a</i>			
	Mukosa	Kornea	Nephrophan®	
			90 min	300 min
EBS	2,19 ± 0,78	0,73 ± 0,15	2,82 ± 0,58	3,09 ± 0,84
	Ø	44,9 ± 23,0	Ø	Ø
ME-PG	1,98 ± 0,47	nicht berechenbar	0,00 ± 0 *	0,00 ± 0 *
	25,1 ± 12,5	nicht berechenbar	nicht berechenbar	nicht berechenbar
ME-CD	1,78 ± 0,89	nicht berechenbar	0,61 ± 0,13 **	0,72 ± 0,04 **
	22,5 ± 15,6	nicht berechenbar	15,3 ± 9,8	Ø

^a ± SD, n = 5; * signifikant (* p < 0,05; ** p < 0,01) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Abweichend hiervon ergaben die P_{eff} der ME für die Mukosa keinen Unterschied zum EBS-Wert (Tabelle 12). Das Verteilungsverhalten von AD in der Zubereitung und zur Membran nimmt hier offenbar keinen Einfluss auf die Permeation des Wirkstoffs. Der Lipidgehalt der Mukosa, der von Corbo et al. [48] für Kaninchen mit 12% ermittelt wurde, scheint in diesem Fall eine zusätzliche lipophile Phase darzustellen, durch die AD relativ leicht zu permeieren vermag. Allerdings beginnt aus beiden ME die Mukosa-Permeation verzögert, wie aus der ermittelten Lag-time (Tabelle 12) zu ersehen ist. Der Konzentrationsgradient in der Membran kann sich vermutlich, bedingt durch die verlangsamte Diffusion von AD aus dem Trägersystem an die Grenzfläche, nur verzögert aufbauen.

Für eine weitere Interpretation dieser Ergebnisse könnte eine Permeation aus IPM hilfreich sein. Diese war jedoch zum gegebenen Zeitpunkt nur noch für Nephrophan® und Kornea durchführbar, da Arbeiten mit Rinder-Mukosa aufgrund der nach der BSE-Krise drastisch erhöhten Sicherheitsauflagen (Arbeiten mit Hochrisiko-Material) nicht mehr durchgeführt werden konnten. Aus der lipophilen Grundlage IPM permeierte AD erwartungsgemäß weder durch Kornea noch durch Nephrophan® innerhalb der Versuchszeiten. Möglicherweise ist jedoch eine Permeation des AD durch die lipophile Mukosa zu einem gewissen Grad möglich und könnte den im Vergleich zu den anderen Membranen kaum reduzierten P_{eff} aus ME-PG

erklären. Berndt [74] fand aus Rizinusöl eine stark verminderte, aber messbare Permeation von AD durch Rindernasenmukosa.

Um den Einfluss von HP- γ -CD in ME-CD auf das AD-Permeationsverhalten durch Mukosa differenziert beurteilen zu können, wurden Versuche mit der ME-Grundmischung (GM), d.h. ohne HP- γ -CD im Trägersystem (s. Kap. 4.1.2), durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Herstellung von ME-CD in der Weise variiert, dass AD in die isolierte lipophile Phase (AD_{lip}), anstatt wie üblich in die hydrophile Phase, inkorporiert wurde (s. Kap. 5.2.2). Die gemessenen P_{eff} sind in Abb. 13 als Balkendiagramm dargestellt, um den Trend der Werte zu veranschaulichen, da sich bei der statistischen Auswertung der Daten keine signifikanten Unterschiede ergaben.

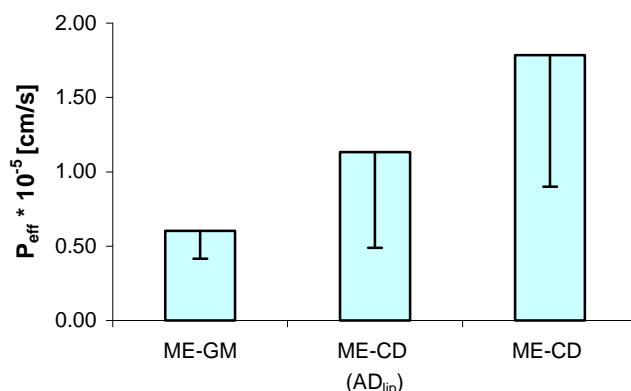


Abb. 13: P_{eff} von AD (25 µg/ml) durch Mukosa für unterschiedlich hergestellte ME-CD bzw. ME-Grundmischung (ME-GM)

Der Zusatz von CD, sowohl bei Einarbeitung von AD in die lipophile (AD_{lip}) als auch in die wässrige Phase (ME-CD) scheinen die Permeation der Substanz gegenüber der GM tendenziell zu begünstigen. Der P_{eff} von AD aus ME-GM liegt in der Größenordnung des Wertes, der mit der 20%igen CrEL-Lösung erhalten wurde (s. Tabelle 11). Wie schon bei den SAXS-Untersuchungen in Kap. 4.1.3.4 angenommen, stellt die GM ein Solubilisat dar, in dem vermutlich auch der zugesetzte Arzneistoff durch CrEL solubilisiert und daher, ebenfalls wie in der 20%igen CrEL-Lösung, in Mizellen eingeschlossen vorliegt (vgl. Kap. 4.2.3.1.2). AD_{lip} stellt ein ME-System dar und weist damit andere innere Strukturen auf, so dass möglicherweise die Fixierung des Arzneistoffs hier schwächer ist, als in den AD-Solubilisaten ME-GM und der 20%igen AD/CrEL-Lösung. Aufgrund der Vorgehensweise bei der

Herstellung von ME-CD wird angenommen, dass HP- γ -CD durch Inkludierung des lipophilen AD verstärkt in den wässrigen Bereichen der Formulierung halten kann (s. oben!).

Um weiterhin den membranunabhängigen Einfluss des Tensids PG sowie den konzentrationsabhängigen Einfluss des Tensids CrEL auf die AD-Permeation näher zu beleuchten, wurde der P_{eff} für 9% PG und 1% CrEL in EBS durch Nephrophan[®] bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: P_{eff} und Lag-time von AD (25 $\mu\text{g/ml}$) durch Nephrophan[®] unter Einfluss von 9% PG und 1% CrEL

Formulierung	P_{eff} [$10^{-5} \cdot \text{cm/s}$] ^a	
	Lag-time [min] ^a	
	Nephrophan [®]	
	90 min	300 min
EBS	2,82 \pm 0,58	3,09 \pm 0,84
	Ø	Ø
PG, 9%	3,72 \pm 0,41 *	3,75 \pm 0,3 *
	Ø	Ø
CrEL, 1%	nicht ermittelt	2,00 \pm 0,56 **
	nicht ermittelt	Ø

^a \pm SD, n = 5-6;

* signifikant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Die gemessenen Werte sind alle signifikant unterschiedlich zum jeweiligen EBS-Wert. PG hat einen permeationsfördernden, CrEL einen -vermindernden Effekt. Da in einer Tensid-lösung oberhalb der CMC die Anzahl an gebildeten Mizellen mit steigender Konzentration linear zunimmt bis schließlich höher organisierte Strukturen auftreten [91], ist das signifikant bessere Permeationsverhalten des AD aus einer 1%igen CrEL-Lösung gegenüber einer 20%igen (P_{eff} : 0,15 bzw. $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$) mit der geringeren Anzahl an Mizellen zu erklären. Möglicherweise liegen in der 20%igen CrEL-Lösung bereits vereinzelt Bereiche mit einem höheren mizellaren Ordnungszustand vor, wobei allerdings in den SAXS-Messungen (vgl. Kap. 4.1.3.4) lamellare Strukturen ausgeschlossen werden konnten. Bereits in der 1%igen Lösung wurde AD jedoch mizellar solubilisiert ($\text{CMC} < 0,1\%$), wodurch seine Permeations-

rate im Vergleich zu EBS vermindert war. Die permeationssteigernde Wirkung des PG könnte auf einer Hydrotropisierung des Arzneistoffs [26] und einer damit verbundenen verbesserten Diffusion des AD zur Membran beruhen. In der Formulierung ME-PG scheint dieser Effekt auf die AD-Permeation jedoch keinen Einfluss zu nehmen (s. Tabelle 12).

4.2.3.1.4 Untersuchungen mit der Mikroemulsion ME-ION und mit HTAP-*b*-CD

In weiteren Experimenten wurde das Permeationsverhalten von AD aus dem System ME-ION (Zusammensetzung vgl. Kap. 4.1.2) mit dem kationischen HTAP- β -CD sowie der Einfluss dieses ionischen CDs auf die Membranen Kornea und Nephrophan[®] untersucht (Tabelle 14).

Tabelle 14: P_{eff} und Lag-time für AD (25 $\mu\text{g/ml}$) aus ME-ION und mit HTAP-*b*-CD

Formulierung	P_{eff} [$10^{-5} \cdot \text{cm/s}$] ^a	
	Lag-time [min] ^a	
	Kornea	Nephrophan [®] 300 min
EBS	0,73 \pm 0,15 44,9 \pm 23,0	3,09 \pm 0,84 Ø
HTAP- <i>b</i> -CD, 9%	0 Ø	1,55 \pm 0,08 ** Ø
ME-ION	0 Ø	1,13 \pm 0,10 ** Ø

^a \pm SD, n = 5

** signifikant ($p < 0,01$) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

In diesem Fall wurde mit Nephrophan[®] lediglich der 300 min-Versuch durchgeführt, da Mukosa nicht mehr mit einbezogen werden konnte (s. vorn!). Das kationische CD (vgl. Kap. 3.5.4) wurde mit der Erwartung ausgewählt, dass durch die der biologischen Membran entgegengesetzte Ladung die Konzentration an AD/CD-Komplexen an der Barriere erhöht werden könnte [78].

Durch die Cellulose-Membran permeierte aus den ionischen CD-Formulierungen nach 300 min signifikant weniger AD als aus EBS. Andererseits lagen die Nephrophan®-Werte für ME-ION tendenziell höher als für ME-CD (s. Tabelle 12, $P_{\text{eff}} = 0,72 \text{ cm/s}$) bzw. für HTAP- β -CD höher als unter Zusatz von HP- γ -CD (s. Tabelle 10, $P_{\text{eff}} = 1,15 \text{ cm/s}$), ergaben jedoch keine Signifikanzen zu diesen Werten.

Wie in Kap. 4.1.4.3 nachgewiesen, wurde AD von HTAP- β -CD inkludiert, wobei für diesen Komplex annähernd dieselbe Komplexstabilitätskonstante ermittelt wurde wie für den HP- γ -CD-Komplex. Aus diesem Grund kann eine Reduzierung der AD-Permeation mit HTAP- β -CD in gleicher Weise diskutiert werden, wie unter HP- γ -CD-Zusatz (s. Tabelle 10 und nachfolgenden Text!).

In Analogie zum Permeationsverhalten aus ME-CD ist auch für ME-ION zu vermuten, dass das CD den Arzneistoff in den wässrigen Bereichen des Systems zurückhält (s. oben!). Der Arzneistoff liegt somit in gelöster Form an der Membran vor. Die Reduzierung des VK_{ipm} (s. Kap. 4.1.4.1) durch HTAP- β -CD von 149,66 auf $0,81 \pm 0,05$ unterstützt diese Annahme.

Darüber hinaus ist eine elektrochemische Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Kornea-Epithel-Oberfläche [71] und dem kationischen CD denkbar und könnte eine Kumulierung von Arzneistoff am Epithel bewirken bzw. einen enhancenden Effekt ausüben [79]. Jedoch erfolgte keine Erhöhung der Permeationsrate. Klang et al. [81] fanden dagegen bei In-vivo-Studien an Kaninchen erhöhte Wirkstoffspiegel für Indomethacin im Kammerwasser und in der Netzhaut nach Verabreichung aus einer kationischen im Vergleich zu einer negativ geladenen Submikronemulsion und führen dies auf eine verlängerte Wechselwirkung zwischen Formulierung und Epithel zurück.

4.2.3.1.5 Permeationsrate

Der Vollständigkeit halber und zum besseren Vergleich der Daten sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 15) die kumulierten Substanzmengen für die Versuche aufgelistet, für die infolge zu langer Lag-time kein P_{eff} berechnet werden konnte. Die betreffenden Werte sind grau unterlegt dargestellt, da daneben die Ergebnisse für die nicht betroffenen Membranen sowie alle EBS-Werte zum Vergleich aufgelistet sind.

Die beiden ME-Zubereitungen erreichten für die Mukosa gleiche Durchtrittsraten, wiesen aber für die Kornea und Nephrophan® tendenzielle bzw. signifikante Unterschiede auf. Hier scheint in beiden Fällen ME-CD die geeignetere Grundlage für eine AD-Permeation zu sein. Die Zusätze von HP- γ -CD und CrEL führten, insbesondere bei der Kornea, zu extrem

niedrigen Durchtrittsraten. Im Falle der Mukosa fällt lediglich die Reduzierung durch CrEL als signifikant auf.

Tabelle 15: Kumulierte AD-Mengen (Q) [$\mu\text{g/ml}$] ^a nach der jeweiligen Gesamtpermeationszeit

Formulierung	Mukosa	Kornea	Nephrophan [®]	
	90 min	300 min	90 min	300 min
EBS	1,56 \pm 0,67	0,73 \pm 0,15	1,62 \pm 0,36	6,66 \pm 1,75
HP- γ -CD, 9%	0,84 \pm 0,60	0,09 \pm 0,07 **	0,75 \pm 0,08 **	3,30 \pm 0,26 **
CrEL, 20%	0,41 \pm 0,14 **	0,05 \pm 0,04 **	0,21 \pm 0,18 **	0,40 \pm 0,07 **
ME-PG	1,00 \pm 0,44	0,02 \pm 0,02 **	0,00 \pm 0 **	0,00 \pm 0 **
ME-CD	1,00 \pm 0,69	0,11 \pm 0,04 **	0,43 \pm 0,11 **	1,95 \pm 0,13 **

^a \pm SD, n = 5

** signifikant ($p < 0,01$) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

4.2.3.1.6 Kapitel-Zusammenfassung

Die wichtigsten Resultate der vorangehend beschriebenen Permeationsstudien mit AD werden nachfolgend stichpunktartig aufgelistet:

- Die Mukosa wies grundsätzlich höhere Peff auf als die Kornea, und der Einfluss der Additiva und Formulierungen auf die Permeabilität war weniger ausgeprägt.
- Bei der Permeation durch hydrophile (Nephrophan[®]) oder teilweise hydrophile (Kornea) Membranen scheint vor allem dem Polaritätscharakter der jeweiligen Formulierung und damit dem Verteilungsverhalten des Arzneistoffs sowohl innerhalb der Formulierung als auch gegenüber der Membran eine wesentliche Rolle zuzukommen.
- Lediglich für HP- γ -CD in einem molaren Verhältnis zu AD von 1:1 bzw. 1:2 konnte eine signifikante Steigerung der Peff durch Kornea im Vergleich zum EBS-Wert detektiert werden.

- In höherer Konzentration von 9% verursachten beide CD (HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD) eine signifikante Verminderung der Arzneistoff-Permeation durch alle jeweils getesteten Membranen.
- Eine 20%ige CrEL-Lösung, die den Arzneistoff zu solubilisieren und mizellar einzuschließen vermag, führte für alle Membranen zu einer deutlichen Reduzierung des AD-Durchtritts.
- Beim Vergleich von ME-CD und ME-PG wurde hinsichtlich der AD-In-vitro-Verfügbarkeit die Zubereitung ME-CD als vorteilhaft beurteilt. Aufgrund von Interaktionen zwischen AD und HP- γ -CD wird der Wirkstoff vermutlich in den hydrophilen Bereichen der Formulierung gehalten und steht an der Membran in höherer Quantität zur Verfügung.
- Zur Erzielung lokaler Effekte, wie es für eine okulare Anwendung des AD vorgesehen ist, könnte ME-ION aufgrund des kationischen Charakters eine besonders geeignete Trägerformulierung darstellen, da in diesem Fall, vermutlich aufgrund von Membran-Wechselwirkungen des CD mit dem Kornea-Epithel, kein Durchtritt von AD detektiert wurde und somit nicht die gleichen Effekte vorherrschend waren wie bei ME-CD.

4.2.3.2 Testosteron

Ein Vergleich mit dem Permeationsverhalten des TST aus EBS durch alle Membranen erbrachte signifikant niedrigere P_{eff} als für AD (Tabelle 16).

Bei der In-vitro-Permeation von AD, der physiologischen Vorstufe des TST, resultierte für alle drei Gewebe eine höhere Permeationsrate. Vor allem die Kornea zeigte für AD eine doppelt so hohe Permeabilität wie für TST. Aus der Literatur konnte entnommen werden, dass TST einen höheren Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten aufweist als AD [137; in 138 angegeben als $\log p = 3,22$], so dass eine Verschlechterung der Permeationsrate - besonders für Nephrophan® und Kornea – zumindest partiell mit der erhöhten Lipophilie des Wirkstoffs zu erklären ist.

Da aber auch für die eher lipophile Mukosa ein signifikanter Rückgang des P_{eff} bei TST ermittelt wurde, müssen weitere Faktoren auf die Permeabilität dieses Arzneistoffs Einfluss nehmen. Im Fall der biologischen Gewebe kann ein, im Vergleich zu AD möglicherweise bevorzugter, enzymatischer Umsatz des TST in Betracht gezogen werden, der für Kornea und Mukosa mehrfach beschrieben [43, 139 - 142] und in Kap. 4.3 näher untersucht wird.

Möglicherweise sind die Schwankungen der Lag-time durch Kornea ebenfalls auf einen Einfluss von Enzymen zurückzuführen.

Tabelle 16: P_{eff} und Lag-time von AD und TST (beide 25 µg/ml) jeweils aus EBS

Wirkstoff	P_{eff} [$10^{-5} \cdot \text{cm/s}$] ^a			
	<i>Lag-time [min]</i>			
	Mukosa *	Kornea **	Nephrophan [®]	
			90 min **	300 min *
AD	2,19 ± 0,78	0,73 ± 0,15	2,82 ± 0,58	3,09 ± 0,84
	Ø	44,9 ± 23,0	Ø	Ø
TST	1,58 ± 0,97	0,32 ± 0,21	1,52 ± 0,30	2,26 ± 0,33
	Ø	42,6 ± 44,9	Ø	Ø

^a ± SD, n = 5

Signifikanzen der P_{eff} -Werte ermittelt im t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist eine gesteigerte Bioverfügbarkeit des AD im Gegensatz zu TST anzunehmen. Diese Beobachtung war hier unabhängig vom getesteten Membrantyp prinzipiell zu konstatieren, wobei aber für eine Wertung der Ergebnisse der Vergleich mit In-vivo-Studien unbedingt erforderlich ist.

4.2.3.3 Fluorescein-Na

Um die unterschiedlichen Trägersysteme sowie das Arzneistoff-Verteilungsverhalten in diesen bzw. gegenüber der Membran näher zu charakterisieren und die Auswirkungen auf die Permeabilitäten von Schweinekornea¹ und Nephrophan[®] weiter zu untersuchen, wurden Studien mit der hydrophilen Modellschubstanz Fluorescein-Na (FSC) durchgeführt.

FSC durchdringt eine biologische Membran bevorzugt auf parazellulärem Wege, während bei dem lipophilen AD der transzelluläre Permeationsweg dominiert. Eine parazelluläre Permeation wird in stärkerem Maße von Parametern, wie der Molekülgröße der Substanz [19, 20, 143], dem pH-Wert [43, 144] sowie dem Elektrolytgehalt in der Lösung [44], und

¹ Mukosa konnte hier leider aus den auf S. 56 beschriebenen Gründen nicht mehr mit einbezogen werden.

auch weiteren Komponenten der Formulierung [112] beeinflusst. Beispielsweise bewirkt ein Absenken der Ca^{2+} -Konzentration durch Applikation eines Chelat-Bildners eine Expansion der Interzellularräume und damit einen Anstieg der parazellulären Permeabilität [145, 146]. Der FSC-Transport ist daher abhängig von der Größe und Anzahl wässriger Poren in der Membran sowie vom Zustand der Tight-junctions, die die Zellzwischenräume nach außen hin mehr oder weniger abdichten. Die ermittelten P_{eff} und die jeweilige Lag-time aus den Permeationsstudien mit FSC sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Die für Nephrophan® ermittelten P_{eff} lagen für FSC in der gleichen Größenordnung wie die Werte für AD (vgl. Tabelle 10 – 14), wohingegen die Kornea für FSC weniger permeabel war und Permeationskoeffizienten ergab, die um eine Zehnerpotenz niedriger lagen als für AD. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit dem bereits erwähnten und aus der Literatur bekannten Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizient (vgl. Kap. 4.1.4.1) und Permeation [47, 147]. Ein Vergleich mit P_{eff} -Werten für FSC durch Kaninchenkornea aus der Literatur ergibt ebenfalls eine gute Übereinstimmung [148]. Die Zugabe der Formulierungshilfsstoffe und ME zur Donatorlösung bewirkte ein signifikantes Absinken der P_{eff} -Werte gegenüber der Referenz mit EBS, mit Ausnahme der ME-ION, die für die biologische Membran nur eine tendenzielle Minderung der Permeabilität erbrachte.

Ein Zusatz von 9% HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD senkte die Permeation von FSC durch Nephrophan® und Kornea signifikant, wobei HTAP- β -CD den tendenziell stärkeren Einfluss ausübte (Tabelle 17). Für die Lag-time der Kornea-Versuche konnte unter Zugabe der CD eine Abnahme detektiert werden (signifikant für HTAP- β -CD). Die Wechselwirkung zwischen FSC und den CD wurde nicht näher untersucht, aber aufgrund der Permeationsergebnisse ist eine Inklusion der Substanz in beide CD nicht auszuschließen. In der Literatur konnten Hinweise auf CD-Inklusionsbildungen mit hydrophilen Stoffen gefunden werden [101, 128, 149].

Tabelle 17: P_{eff} und Lag-time von FSC (25 µg/ml) durch Kornea und Nephrophan®

Formulierung	P_{eff} [$10^{-6} \cdot \text{cm/s}$] ^a <i>Lag-time [min]</i> ^a	
	Kornea	Nephrophan® 300 min
EBS	0,99 ± 0,86 <i>120,2 ± 22,2</i>	34,3 ± 5,4 Ø
HP-g-CD 9%	0,37 ± 0,29 * <i>94,1 ± 37,3</i>	17,2 ± 1,2 ** Ø
HP-g-CD vi	0,49 ± 0,70 <i>123,8 ± 36,3</i>	nicht ermittelt
CrEL 20%	0,15 ± 0,08 ** <i>95,5 ± 30,1</i>	22,8 ± 1,7 ** Ø
CrEL vi	0,48 ± 0,48 <i>121,1 ± 21,9</i>	nicht ermittelt
HTAP-b-CD 9%	0,18 ± 0,24 ** <i>72,6 ± 56,7**</i>	14,5 ± 1,0 ** Ø
HTAP-b-CD vi	0,74 ± 0,55 <i>126,7 ± 25,9</i>	nicht ermittelt
ME-PG	nicht berechenbar <i>nicht berechenbar</i>	19,1 ± 1,6 ** <i>79,5 ± 27,8**</i>
ME-CD	0,13 ± 0,05 ** <i>145,4 ± 22,7</i>	11,8 ± 1,7 ** <i>56,0 ± 9,5**</i>
ME-ION	0,48 ± 0,26 <i>151,8 ± 20,7</i>	15,4 ± 1,3 ** Ø

^a ± SD, n = 9

* signifikant (* p<0,05; ** p<0,01) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Auch hydrophile Interaktionen mit der äußeren Hülle der CD-Moleküle kommen in Betracht. Für HTAP- β -CD sind darüber hinaus aufgrund der gegensätzlichen Ladung zu FSC ionische Wechselwirkungen anzunehmen, die die stärkere Reduzierung der FSC-Permeation gegenüber HP- γ -CD erklären könnten.

Mit den CD vergleichbare Effekte bewirkte ein Zusatz von CrEL (Tabelle 17), der den Permeabilitätskoeffizienten und ebenfalls die Lag-time für den Durchtritt von FSC durch Kornea absenkte. Im Fall von Nephrophan[®] war die FSC-Permeation mit CrEL im Vergleich zu HP- γ -CD und HTAP- β -CD signifikant höher, jedoch gegenüber EBS ebenfalls signifikant reduziert. Für das hydrophile FSC wird im Gegensatz zum lipophilen AD keine Einlagerung in die Tensid-Mizellen, sondern eher eine Interaktion mit den hydrophilen Kopfgruppen des CrEL angenommen. Möglicherweise sind die Tensid-Wechselwirkungen in diesem Fall schwächer als die CD-Interaktionen und können die unterschiedlichen P_{eff} durch Nephrophan[®] erklären.

Eine Vorinkubierung des biologischen Gewebes mit den CD bzw. CrEL führte lediglich zu einem tendenziellen aber nicht signifikanten Absinken der Permeabilität. Die Lag-time blieb nach Vorinkubation mit allen drei Adjuvantien unverändert. Da im Gegensatz hierzu in Anwesenheit der drei Zusätze im Donatormedium jeweils kürzere Verzögerungszeiten ermittelt wurden, ist anzunehmen, dass ein reversibler, eventuell primär enhancender Effekt auf das Kornea-Epithel ausgeübt wird. Es wäre denkbar, dass die CD ein temporäres Öffnen der Tight-junctions, wie Martin et al. [150] für RAMEB¹ beschreiben, Poren oder eventuell Ionenkanäle [6] initiieren. CrEL dagegen kann sich durch seinen amphiphilen Charakter, wie schon bei den AD-Versuchen angenommen (vgl. Kap. 4.2.3.1.2), an die biologische Membran anlagern oder aber aufgrund von Wechselwirkungen mit der Zellmembran den Zellverband auflockern und ein Eindringen von Substanzen erleichtern [136]. Es ist anzunehmen, dass diese Effekte jedoch hauptsächlich auf den parazellulären Transportweg beschränkt bleiben, da vergleichbare Beobachtungen für AD nicht gemacht werden konnten.

Allerdings müssen bei einer Interpretation dieser Ergebnisse die Fehlergrenzen der P_{eff} berücksichtigt werden (Tabelle 17), die für das biologische Gewebe sehr hoch lagen. Vor allem für die Vorinkubationsversuche wurden extrem hohe Standardabweichungen detektiert. Als Ursache werden Veränderungen der parazellulären Membrandurchlässigkeit angenommen, die für das isolierte Epithel beispielsweise mittels TEER-Messungen

¹ RAMEB = *randomly methylated β -cyclodextrin*

(Transepithelial electrical resistance) nachgewiesen werden könnten [151]. Möglicherweise war die Vorinkubationszeit von 30 min für eine gleichmäßige Equilibrierung des Gewebes nicht ausreichend, oder die Vorinkubationssubstanz konnte nicht hinreichend aus der Donatorkammer bzw. von der Membranoberfläche, wie auch in den AD-Versuchen (vgl. Kap. 4.2.3.1.1 bzw. 4.2.3.1.2) beobachtet, ausgewaschen werden.

Zur Erläuterung des Einflusses der Additiva auf das Permeationsverhalten von FSC muss differenziert werden zwischen direkten Effekten dieser Substanzen an der Membran und Wechselwirkungen mit dem FSC, die bereits in der Donatorlösung stattfinden. Die Passage des lipophilen Kornea-Epithels stellt für das hydrophile FSC den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Permeation dar [20]. Wenn bei einigen Messungen die Lag-time deutlich reduziert war (beide CD und CrEL, Tabelle 17), ist für diese Additiva eine reversible Verbesserung der Permeabilität des Epithels für FSC zu diskutieren (s. oben!). Andererseits können aber parallel dazu auch Wechselwirkungen der Komponenten in der Donatorlösung für einen permeationsmindernden Effekt verantwortlich sein, wofür die durch die Additiva signifikant erniedrigten P_{eff} durch Nephrophan® sprechen. Für die künstliche Membran kann eine direkt permeationsfördernde Modifikation ausgeschlossen werden. Die hydrophile Glykokalix auf dem Kornea-Epithel wird für die Permeation des hydrophilen FSC als wenig bedeutsam erachtet.

Für die drei ME ergab sich eine Reihenfolge der P_{eff} des FSC durch Kornea von ME-ION > ME-CD > ME-PG, wobei ME-ION und ME-CD statistisch nicht signifikant voneinander verschieden sind. Durch Nephrophan® zeigte ME-PG gegenüber den anderen ME-Systemen einen signifikant höheren P_{eff} , so dass eine Reihenfolge von ME-PG > ME-ION > ME-CD mit jeweils signifikanten Unterschieden resultierte.

Das System ohne CD (ME-PG) verminderte also im Vergleich zu den CD-haltigen Systemen die FSC-Permeation durch Nephrophan® in geringerem Ausmaß. Das enthaltene Tensid CrEL bewirkte als Einzelsubstanz bei Nephrophan® im Vergleich zu den CD eine schwächere Minderung der FSC- P_{eff} (s. oben!), so dass die beobachteten Effekte bei den ME-Permeationen teilweise durch ihre differenzierte Zusammensetzung (vgl. Tabelle 4) begründet sein können, wobei allerdings der Einfluss von PG nicht im Einzelnen berücksichtigt ist. Die erhöhte Lag-time bei ME-CD bzw. ME-PG wurde vermutlich durch Interaktionen der Substanzen in der Donatorlösung hervorgerufen, da Effekte an der synthetischen Membran ausgeschlossen werden können.

Für die Kornea erreichte ME-ION als einzige ME eine zur EBS-Lösung statistisch nicht unterschiedliche FSC-Permeation (Tabelle 17), was bedeutet, dass die Wechselwirkungen

der Einzelkomponenten CrEL und HTAP- β -CD mit FSC nicht dominiert haben. Da die Lag-time ebenfalls deutlich anstieg, scheinen die Effekte der Einzelkomponenten am Kornea-Epithel ebenfalls abgeschwächt zu sein, was genauso für ME-CD zutreffend ist. Beachtenswert ist zudem, dass durch Nephrophan[®] aus ME-ION im Gegensatz zu den anderen ME keine Lag-time ermittelt wurde, was ebenfalls für geringe Wechselwirkungen der Substanzen in der Donatorlösung spricht.

Kapitel-Zusammenfassung

Bei den Permeationsstudien mit dem hydrophilen FSC konnten sowohl Effekte der einzelnen Additiva an der biologischen Membran als auch Wechselwirkungen der Komponenten in der Donatorlösung, die bei den Nephrophan[®]-Versuchen zum Ausdruck kamen, festgestellt werden. Die Diskussion der wichtigsten Ergebnisse der FSC-Permeationsstudien lässt sich stichpunktartig folgendermaßen zusammenfassen:

- Bei alleiniger Beeinträchtigung der Permeabilität durch Wechselwirkungen der Substanzen untereinander, wie sie bereits in der Donatorlösung auftreten und für die Resultate an der Nephrophan[®]-Membran ausschlaggebend sind, lässt sich resümieren, dass mit CrEL eine deutlich schwächere Interaktion mit FSC erfolgt als mit den beiden CD.
- Die parazelluläre Permeation des FSC wird offenbar durch Effekte der Additiva CrEL, HP- γ -CD und HTAP- β -CD am Kornea-Epithel erleichtert, was sich in einer Abnahme der Lag-time im Vergleich zum Referenz-Medium EBS zeigte, die für HTAP- β -CD am deutlichsten war. Jedoch wurden gleichzeitig sowohl für die Kornea als auch für Nephrophan[®] bei Zugabe dieser Additiva verminderte P_{eff} gemessen, was möglicherweise für simultane permeationsmindernde Interaktionen der Substanzen mit FSC spricht.
- Die elektrochemische Wechselwirkung von FSC mit HTAP- β -CD, der in Pufferlösung die signifikante Reduzierung des P_{eff} zugeschrieben wird, scheint in ME-ION dagegen durch die anderen strukturbildenden Komponenten abgeschwächt zu sein, weswegen die FSC-Permeation aus dieser Formulierung im Vergleich zum EBS-Wert statistisch unverändert blieb.
- Bei den ME ist zu berücksichtigen, dass es sich nicht einfach um einen Komponentenmix handelt, sondern um komplex strukturierte Systeme, in denen der Arzneistoff „verteilt“ vorliegt, was das Permeationsgeschehen vielschichtig beeinflussen kann. Zwischen Interaktionen der einzelnen Komponenten mit der Membran und mit FSC

kann nicht differenziert werden. Außerdem weisen diese Systeme gegenüber den einfachen Lösungen veränderte physikalisch-chemische Parameter auf wie beispielsweise eine erhöhte Viskosität und bei ME-PG auch eine enorm hohe Tonizität (vgl. Kap. 4.1.3.2).

4.3 Penetrationsstudien

4.3.1 EINFÜHRUNG

Im Gegensatz zur Permeation, die den Stoffdurchgang durch zwei Grenzflächen meint, beschreibt die Penetration den Stoffübergang einer Substanz von einer Phase durch eine Grenzfläche in eine zweite Phase [91].

Die im Folgenden beschriebenen Penetrationsstudien (vgl. Kap. 5.2.11) wurden durchgeführt, um das Verteilungsverhalten von AD bzw. TST zwischen Schweinekornea-Epithel bzw. Rindernasemukosa und Inkubationsmedium zu erfassen. Die Penetrations- bzw. Permeationsrate einer Substanz sowie ihre Verteilungskoeffizienten für die Systeme Oktanol/Wasser bzw. Donatorlösung/ Membran stehen in engem Zusammenhang [152] und können Hinweise auf die Absorption einer Substanz aus einer Formulierung geben.

Darüber hinaus kann eine Substanz während ihres Membrandurchtritts einem enzymatischen Abbau unterliegen, wodurch die entsprechende Verfügbarkeit dieser Substanz vermindert wird. Wie unter Kap. 5.2.10 beschrieben, war bei einigen Permeationsstudien mit AD durch Mukosa vor allem unter schwacher Agitation der Kammern ein Auftreten von TST im Akzeptorkompartiment zu konstatieren. Die physiologische Umwandlung des AD in TST erfolgt durch das Enzym 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit NADH + H⁺ als Redoxpartner und Coenzym. Für die Nasenschleimhaut sowie für mehrere Gewebe am Auge wurde eine Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen [34, 139, 140], so dass anzunehmen ist, dass nach Applikation von AD vor und während der Absorption eine enzymatische Umwandlung in TST erfolgen kann. Für den Steroid-Metabolismus zusätzlich von Relevanz ist unter anderem die 5 α -Reduktase, die TST und AD hauptsächlich in die Metaboliten 5 α -Dihydroxytestosteron bzw. 5 α -Androstandion umwandelt, was aber mit der hier angewandten Analytik nicht nachgewiesen wurde. Die beiden Testsubstanzen (AD und TST) konnten jedoch mittels HPLC parallel analysiert werden.

Am Beispiel des Kornea-Epithels wurde außerdem der Einfluss der drei ME (vgl. Tabelle 4) bzw. deren Einzelkomponenten HP- γ -CD, HTAP- β -CD, CrEL und PG auf die Gewebekonzentration des Wirkstoffs (AD bzw. TST) sowie den enzymatischen Umsatz von AD zu TST und umgekehrt untersucht. Die Wirkstoffkonzentration wurde in allen Versuchen jeweils nach Inkubation des Gewebes (vgl. Kap. 5.2.11) im Überstand der zentrifugierten Probelösung bestimmt und mit dem Gewicht der einzelnen Gewebeprobe normiert.

4.3.2 RINDERNASENMUKOSA

Die Mukosa enthält neben der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) eine Reihe weiterer Enzyme, die die Permeation einer Substanz beeinträchtigen können und somit eine Art zusätzliche „Barriere“ bilden [14]. Für Cytochrom P-450-Enzyme wurde sogar eine höhere Aktivität nachgewiesen als in der Leber [34]. Daraus muss jedoch prinzipiell keine schlechtere Resorption des betreffenden Wirkstoffs folgen. Für eine Reihe von Substanzen wurde nach nasaler Applikation eine absolute Bioverfügbarkeit von nahezu 100% nachgewiesen, so z.B. für Progesteron, Testosteron, Estradiol, Naloxon oder Propranolol [153]. Möglicherweise ist für diese Stoffe die Permeabilität so hoch, dass die Kontaktzeit mit der Membran bzw. deren Enzymen minimal ist. Anders verhält es sich beispielsweise bei der nasalen Resorption von Proteinen oder Peptiden, die zu einem beträchtlichen Anteil von Peptidasen oder Esterasen metabolisiert werden [154].

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse für die Penetration und Metabolisierung von AD in Rindernasemukosa angegeben. Die Wirkstoffkonzentration in der Lösung wurde mit dem jeweiligen Gewicht des inkubierten Gewebestücks normiert, so dass die dargestellten Werte keine Gewebekonzentrationen bedeuten, sondern die Konzentration im Überstand der Lösung angeben (vgl. Kap. 5.2.11.1).

Die Mukosa wurde in diesen Studien nicht zerkleinert, sondern, wie für die Permeationsstudien beschrieben (vgl. Kap. 5.2.10.1), gewonnen und als intakte Membran verwendet, so dass in den Zellen lokalisierte Enzyme möglicherweise nur partiell in die Lösung gelangen und mit dem Substrat in Kontakt kommen konnten. Andererseits ist zu erwarten, dass aufgrund der Diffusion des Wirkstoffs und seines Metaboliten sowohl ein intra- als auch extrazellulärer Umsatz stattfindet. Für die 17 β -HSD wurde zudem eher eine Lokalisierung an der Geweboberfläche gefunden [43].

Tabelle 18: Penetration und Metabolisierung von AD aus EBS in Mukosa

Ausgangsmenge [µg/ml•mg Gewebe] ^a	AD [µg/ml•mg Gewebe] ^b	TST [µg/ml•mg Gewebe] ^b
0,749 ± 27,1	0,757 ± 0,225 [101,1%]	0,034 ± 0,019 [4,5%]

^a Mittelwert ± relativer Fehler [%], n = 10 ^b Mittelwert ± SD, n = 10,
Prozent der Ausgangskonzentration in eckigen Klammern

In diesem Versuch wurde praktisch die eingesetzte Gesamtmenge an AD vollständig im Zentrifugat wiedergefunden (Tabelle 18), so dass sowohl eine Verteilung ins Gewebe als auch ein enzymatischer Umsatz zu weiteren Metaboliten allenfalls in sehr geringem Maße stattgefunden hat. Abweichungen der AD-Wiederfindungsrate über 100% der Ausgangskonzentration resultieren aus der Normierung der Werte mit dem Gewebegewicht und anschließender Mittelwertbildung.

Tabelle 19: Penetration und Metabolisierung von TST aus EBS in Mukosa

Ausgangskonz. [µg/ml•mg Gewebe] ^a	TST [µg/ml•mg Gewebe] ^b	AD [µg/ml•mg Gewebe] ^b
0,600 ± 33,9	0,687 ± 0,324 [114,5%]	0,037 ± 0,015 [6,2%]

^a Mittelwert ± relativer Fehler [%], n = 10 ^b Mittelwert ± SD, n = 10,
Prozent der Ausgangskonzentration in eckigen Klammern

Ein Vergleich mit den Permeationsergebnissen aus Kap. 4.2.3.1 zeigt, dass AD aus EBS ohne Verzögerung durch die Mukosa permeierte und annähernd der gleiche P_{eff} -Wert resultierte wie bei der Porendiffusion durch Nephrophan[®], was theoretisch einen nahezu ungehinderten Durchtritt des AD durch die Mukosa bedeutet. Es wird daher vermutet, dass sich während des Penetrationsversuches innerhalb kurzer Zeit die Konzentration von AD im Gewebe im Gleichgewicht mit der Lösungskonzentration befindet. Eine Wiederfindung von nahezu 100% bedeutet daher vermutlich nicht, dass die Membran kein Lösungsvermögen für die Substanz aufweist, sondern eher dass keine Kumulation bzw. Adsorption im oder am Gewebe stattfindet.

Entsprechend der unter Kap. 5.2.11.1 beschriebenen Versuchsanordnung wurde zudem der AD-Gehalt in den Gewebestücken bestimmt und eine mittlere Konzentration von 0,041 µg/mg Gewebe \pm 28,0% gefunden. Bei dieser Versuchsreihe war in keiner der Proben (n = 10) TST zu detektieren, so dass möglicherweise ein zytosolischer Umsatz von AD auszuschließen ist, vermutlich aber die Konzentration an TST im Gewebe unter der Nachweisgrenze (vgl. Kap. 5.2.1.1) lag.

Die Penetration und Metabolisierung von TST zu AD in der Rindernasenmukosa ergab vergleichbare Werte, die in Tabelle 19 aufgelistet sind.

Die Permeation von TST durch Mukosa war signifikant geringer als der AD-Durchtritt (vgl. Tabelle 16), lag aber wiederum in einer ähnlichen Größenordnung wie durch Nephrophan®. Es wird daher vermutet, dass TST ein ähnliches Penetrationsverhalten zeigt, wie es für AD diskutiert wurde (s. oben!) und in dieser Versuchsanordnung einer mit dieser Substanz vergleichbaren Metabolisierung durch 17β-HSD unterliegt.

4.3.3 SCHWEINEKORNEA-EPITHEL

Für die Studien an Schweineaugen wurde lediglich das lipophile Epithel der Kornea genutzt, da eine Verteilung des Arzneistoffs primär zwischen der applizierten Lösung bzw. Formulierung und dieser Schicht stattfindet. Eine potentielle enzymatische Metabolisierung während einer Arzneistoffpermeation ist ebenfalls verstärkt im Epithel zu vermuten.

Das Stroma macht ca. 90% der Kornea insgesamt aus, ist aber nur zu 10% aus zellulären Bestandteilen aufgebaut, so dass sein Anteil an Enzymen als bedeutungslos erachtet werden kann [13]. Das Endothel zeigt wesentlich geringere Aktivitäten für NADPH-abhängige Enzyme, wie beispielsweise die Glutathionreduktase und die Isocitratdehydrogenase, als das Epithel [13], so dass auch für die NAD-abhängige 17β-HSD eine niedrigere Aktivität zu erwarten ist, und diese Gewebeschicht in den vorliegenden Studien nicht berücksichtigt wurde. Das Kornea-Epithel kam als Gewebehomogenat zur Anwendung (vgl. Kap. 5.2.11.2), da es nicht als zusammenhängende Schicht gewonnen werden konnte. Entsprechend dieser Versuchsdurchführung war ein höherer enzymatischer Umsatz zu erwarten als bei einer Passage der Substanz durch die Membran, da sich vermehrt Enzyme aus dem Zellinneren in Lösung befinden [31].

In den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 20 und 21) sind die jeweilige Penetration und Metabolisierung von AD bzw. TST im Kornea-Epithel aufgeführt, wobei die analytische Erfassung der beiden Wirkstoffe wiederum als Restkonzentration in der zentrifugierten Lösung erfolgte.

Darüber hinaus wurden die AD- bzw. TST-Verteilung und Metabolisierung am Kornea-Epithel aus den drei ME sowie deren Einzelkomponenten in EBS-Puffer (HP- γ -CD, HTAP- β -CD, CrEL, PG) untersucht. Die Wirkstoffkonzentration in der Lösung wurde hier ebenfalls mit dem jeweiligen Gewicht des inkubierten Gewebekomogenats normiert, so dass die dargestellten Werte wiederum keine Gewebekonzentrationen bedeuten.

Tabelle 20: Penetration und Metabolisierung von AD im Kornea-Epithel

Testlösung	Ausgangskonz. ^a [$\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{mg}$ Gewebe]	AD ^b [$\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{mg}$ Gewebe]	TST ^b [$\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{mg}$ Gewebe]
EBS	0,40 \pm 6,5	0,114 \pm 0,012 [28,5%]	0,0045 \pm 0,0007 [1,1%]
HP- γ -CD (9%)	0,54 \pm 6,7	0,375 \pm 0,026** [69,4%]	0,0042 \pm 0,0003 [0,8%]
HTAP- β -CD (9%)	0,51 \pm 11,9	0,299 \pm 0,038** [58,6%]	0,0042 \pm 0,0006 [0,8%]
CrEL (20%)	0,41 \pm 15,4	0,408 \pm 0,025** [99,5%]	0,0068 \pm 0,0069 [1,7%]
PG (9%)	0,45 \pm 6,0	0,140 \pm 0,021 [31,1%]	0,0095 \pm 0,0030 [2,1%]
ME-CD	0,43 \pm 4,8	0,427 \pm 0,111** [99,3%]	0,0135 \pm 0,0127 [3,1%]
ME-ION	0,59 \pm 8,9	0,523 \pm 0,028** [88,6%]	0,0071 \pm 0,0025 [1,2%]
ME-PG	0,40 \pm 7,9	0,382 \pm 0,043** [95,5%]	0,0141 \pm 0,0016 [3,5%]

^a Mittelwert \pm relativer Fehler [%], n = 5 ^b Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 5

signifikant (** p<0,01) zum EBS-Wert

Prozent von der Ausgangskonzentration in eckigen Klammern

Bei einem Vergleich der EBS-Werte in Tabelle 20 bzw. Tabelle 21 mit Tabelle 18 bzw. Tabelle 19 fällt auf, dass die kornealen Wiederfindungsraten sehr viel geringer sind als bei Mukosa und die Umwandlung von TST in AD im Kornea-Epithel in sehr viel höherem Maße stattfand als in Rindernasenschleimhaut. Bei beiden Geweben wurde ein Umsatz von AD zu TST von 4 – 4,5% der wiedergefundenen Arzneistoffgesamtmenge detektiert, während die

Metabolisierung von TST zu AD im Kornea-Epithel 50% der wiedergefundenen Gesamtmenge gegenüber nur 5% in der Rindernasenmukosa betrug.

Tabelle 21: Penetration und Metabolisierung von TST im Kornea-Epithel

Testlösung	Ausgangskonz. ^a [µg/ml•mg Gewebe]	TST ^b [µg/ml•mg Gewebe]	AD ^b [µg/ml•mg Gewebe]
<i>EBS</i>	0,39 ± 8,4	0,058 ± 0,0136 [14,9%]	0,055 ± 0,010 [14,1%]
<i>HP-g-CD (9%)</i>	0,47 ± 8,5	0,452 ± 0,0350** [96,2%]	0** [0%]
<i>HTAP-b-CD (9%)</i>	0,44 ± 4,7	0,391 ± 0,0226** [88,9%]	0** [0%]
<i>CrEL (20%)</i>	0,43 ± 7,7	0,372 ± 0,0298** [86,5%]	0,044 ± 0,0264 [10,2%]
<i>PG (9%)</i>	0,38 ± 7,5	0,092 ± 0,0128 [24,2%]	0,051 ± 0,0052 [13,4%]
<i>ME-CD</i>	0,38 ± 7,8	0,387 ± 0,0408** [101,8%]	0,060 ± 0,0317 [15,8%]
<i>ME-ION</i>	0,39 ± 12,5	0,396 ± 0,06** [101,5%]	0,037 ± 0,0301 [9,5%]
<i>ME-PG</i>	0,38 ± 9,1	0,377 ± 0,0766** [99,2%]	0,026 ± 0,0267 [6,8%]

^a Mittelwert ± relativer Fehler [%], n = 5 ^b Mittelwert ± Standardabweichung, n = 5,
signifikant (* p<0,05;** p<0,01) zum EBS-Wert des betreffenden Gewebes

Prozent von der Ausgangskonzentration in eckigen Klammern

Die Daten für das Kornea-Epithel zeigen Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ploc et al. [142], die für Rinderkornea-Epithel einen Umsatz von TST in AD zu 48,3% und umgekehrt von AD in TST lediglich zu 9,8% der wiedergefundenen Menge ermittelten. Die Autoren begründen diese unterschiedlichen Metabolismusraten nicht weiter. Möglicherweise sind ein begrenztes Coenzym-Angebot oder parallel ablaufende anderweitige Redox-Prozesse, die den Oxidationsvorgang am TST begünstigen, unter In-vitro-Verhältnissen für diesen Unterschied verantwortlich, wobei jedoch in der Regel steroidhydroxylierende Systeme eine hohe Substrat- und Wirkungsspezifität aufweisen [155].

Die im Kornea-Epithel gegenüber Mukosa deutlich reduzierten Wiederfindungsraten können ein gutes Lösungsvermögen des Kornea-Epithels für die beiden Testhormone andeuten, sind jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen vermutlich eher auf die Zerstörung der kornealen Gewebestrukturen und eine damit einhergehende verstärkte Adsorption von AD bzw. TST an Zellbestandteile oder zytosolische Substanzen zurückzuführen.

Die zugesetzten Hilfsstoffe, mit Ausnahme von PG bei AD als Substrat, sowie die ME-Systeme verminderten verglichen mit Puffer die Verteilung von AD bzw. TST in das Gewebe (Tabelle 20 und 21) und bewirkten einen deutlichen Anstieg der wiedergefundenen Arzneistoffgesamtmenge im Zentrifugat. Dieses Verteilungsverhalten steht im Einklang mit den Resultaten der Permeationsstudien (vgl. Kap. 4.2.3.1), in denen jeglicher Zusatz zur Donatorlösung eine verminderte AD-Permeationsrate zur Folge hatte (s. Tabelle 10-14), sowie partiell mit dem für AD gemessenen Verteilungskoeffizienten (vgl. Kap. 4.1.4.1), der durch CD-Zugabe vermindert wurde. Ein verminderter Durchtritt von AD durch die Kornea unter dem Einfluss der getesteten Additiva und ME könnte demnach durch eine herabgesetzte Verteilung des Arzneistoffs in das Epithel verursacht werden.

Bei Zufügung von HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD zum EBS-Inkubationsmedium verblieb verglichen mit der EBS-Referenz ein deutlich höherer Anteil der jeweiligen Ausgangsverbindung (AD bzw. TST) in der Lösung, während die Konzentration des betreffenden Metaboliten in beiden Fällen sank (Tabelle 20 und 21). Die Verminderung sowohl der Penetration als auch der Metabolisierung von AD bzw. TST ist für beide Substanzen mit einem Einschluss in die jeweilige CD-Kavität zu erklären, der für AD in dieser Arbeit nachgewiesen wurde (vgl. Kap. 4.1.4.3).

Da der Rückgang des Umsatzes von TST unter Zugabe beider CD sehr viel deutlicher war als der von AD - in reiner Puffer-Lösung lag die Hälfte an gemessenem TST metabolisiert als AD vor (Tabelle 21) - wird angenommen, dass die relevante funktionelle Gruppe des TST (OH-Gruppe an C17) sowohl durch HP- γ -CD als auch durch HTAP- β -CD besser abgeschirmt wurde als die Keto-Gruppe des AD und für das entsprechende Enzym nicht mehr zugänglich war. Das wäre beispielsweise durch eine höhere Komplexstabilitätskonstante des TST/CD-Komplexes erklärbar, oder aber durch einen räumlich anders orientierten Einschluss der Moleküle AD bzw. TST. Brewster et al. [56] fanden beispielsweise für eine Inkludierung durch HP- β -CD von Pregnanolon und Pregnenolon, die sich lediglich durch eine Doppelbindung in Ring B des Steroidgerüsts unterscheiden, deutlich verschiedene Komplexstabilitätskonstanten von 4760 mol^{-1} und 9000 mol^{-1} .

Ein Zusatz von PG zum Inkubationsmedium bewirkte für TST als Substrat einen nicht signifikanten Anstieg der Wiederfindungsrate (Tabelle 21), was für den AD-Versuch nicht zutrifft (Tabelle 20). Möglicherweise begünstigt die zusätzliche OH-Gruppe am C17 (vgl. Abb. 6 und 7) eine Hydrotropisierung durch PG, wodurch mehr TST in Lösung verbleibt. Eine allgemeine Verwendung von PG als Lösungsvermittler ist bekannt [26]. Aufgrund dieses selektiven Effektes wäre denkbar, dass in PG/EBS bei quantitativ gleicher Metabolisierungsrate von TST zu AD die Konzentration an Substrat (TST) in der Lösung anstieg. Bezogen allerdings auf die Gesamt-Wiederfindungsrate nahm die Metabolisierung von TST zu AD verglichen zum EBS-Wert ab. Im Falle von AD als Substrat (Tabelle 20) hatte PG weder auf dessen Metabolisierung noch auf die detektierte Substratmenge Einfluss, was wiederum mit dem ermittelten Oktanol-Verteilungskoeffizienten unter PG-Zusatz korreliert (vgl. Kap. 4.1.4.1).

Das in hypermizellarer Konzentration eingesetzte Tensid CrEL ist in der Lage, Wirkstoffe sowie auch lipophile Gewebebestandteile in seine Mizellen aufzunehmen. In Übereinstimmung damit ließen sich bei Addition der Substrat- und Metabolitkonzentration nahezu 100% der eingesetzten Arzneistoffmenge nach Inkubation detektieren, wobei die Konzentration an jeweiligem Metaboliten näherungsweise in der Größenordnung der Referenz (EBS-Wert) lag. In diesem Fall muss, anders als bei den CD, von einer verminderten Umsatzrate ausgegangen werden, da sicher kein selektiver Mizelleinschluss der beiden Substanzen erwartet werden kann. Durch den mizellaren Einschluss des jeweiligen Substrats wird höchstwahrscheinlich der Enzym/Substrat-Kontakt erschwert [14] und somit der Umsatz zumindest zeitlich verzögert, was jedoch aufgrund der gleichbleibenden Inkubationszeit von 90 min nicht erfasst werden konnte. Für andere oberflächenaktive Substanzen, die als Permeations-Enhancer eingesetzt werden, wie beispielsweise Gallensäuresalze, wird vermutet, dass eine gefundene Steigerung der Permeationsrate zumindest teilweise auf einer Inhibierung bestimmter Enzyme beruht [14], wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist.

Die ME-Systeme verhinderten in beiden Versuchsreihen weitgehend eine Verteilung der Wirksubstanz ins Gewebe, so dass für ME-CD bzw. ME-PG in der Summe die eingesetzte Menge Arzneistoff, allerdings besonders bei TST mit einem hohen Fehler behaftet, nach der Inkubation wiedergefunden wurde. Für AD aus ME-ION lag die Wiederfindung mit 90% etwas niedriger. Dieser Befund korreliert gut mit den kornealen Permeationsergebnissen (vgl. Tabelle 12) und kann wiederum eine Erklärung für die verminderten P_{eff} darstellen. Die Metabolisierungsrate war differenziert für die beiden Arzneistoffe sowie drei ME und folgt dem Verhältnis EBS : ME-ION : ME-PG : ME-CD für AD = 1:1:3:3 und für TST = 1:0,7:0,5:1.

Der enzymatische Umsatz wird demnach nicht prinzipiell in den ME unterbunden, sondern von den jeweiligen Verteilungsverhältnissen und/oder inneren Strukturen der ME-Systeme determiniert und teilweise retardiert.

Kapitel-Zusammenfassung

Zusammenfassend kann zu den Penetrations- und Metabolisierungsstudien Folgendes gesagt werden:

- Die Wiederfindungsraten im Zentrifugat aus Kornea-Epithelzellhomogenat in EBS lagen lediglich bei ~30% im Gegensatz zu nahezu 100% bei Mukosa (unzerkleinertes Gewebe).
- Die Metabolisierung von AD erfolgte in beiden Geweben in vergleichbarer Größenordnung (4 - 4,5%), während TST im Kornea-Epithelzellhomogenat einem deutlich stärkeren Umsatz zu AD unterlag.
- Der Zusatz der ME bzw. Additiva hatte, mit Ausnahme von PG bei AD als Ausgangssubstanz, in allen Fällen einen Anstieg der Wiederfindungsraten der jeweiligen Ausgangssubstanz bei wenig veränderter Metabolitkonzentration zur Folge.
- Die Untersuchungen zur Penetration/Metabolisierung stehen in guter Übereinstimmung mit den Permeationsstudien aus Kap. 4.2 und können teilweise die dort gezeigten Effekte erklären.
- In Analogie zu den Permeationsergebnissen lassen sich auch hier die für die Einzelkomponenten erfassten Effekte nicht auf die ME übertragen, was auf die spezifischen ME-Strukturen zurückzuführen ist und eine detaillierte Überprüfung erfordert.

Abschließend sollte einschränkend angemerkt werden, dass mit diesen Untersuchungen nicht entschieden werden kann, ob eine niedrige Wiederfindungsrate im Überstand tatsächlich auf eine Arzneistoff-Verteilung in das Gewebe zurückzuführen ist oder ob weitere Metabolite durch enzymatischen Abbau entstanden sind, die mit Hilfe der eingesetzten Analytik nicht detektierbar waren.

4.4 In-vivo-Studien

Im Gegensatz zur lokalen okularen Anwendung des AD als potentiellcs Tränenstimulans ist es das Ziel einer nasalen AD-Applikation, eine systemische Wirkung zu erreichen. Die drei ME-Systeme zeigten ein akzeptables Lösungsvermögen für AD (vgl. Kap. 4.1.4.2), das ein

Erreichen der therapeutischen Dosis (ca. 7 mg [50]) nach nasaler Gabe zumindest im Fall von ME-CD ermöglichen könnte. Zudem wurden zumindest aus ME-CD und ME-PG in den In-vitro-Permeationsstudien (vgl. Kap. 4.2.3.1.3) im Vergleich zu EBS kaum reduzierte Durchtrittsraten für AD ermittelt. Um die ME hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Trägerformulierungen zur nasalen Anwendung weitergehend zu prüfen, wurden In-vivo-Versuche an Kaninchen durchgeführt (vgl. Kap. 5.2.12). Da die Mukosa von Kaninchen eine dem Menschen ähnliche Struktur aufweist [48], können aus Kaninchenversuchen erste Vorhersagen zur Anwendbarkeit als humanes Arzneimittel getroffen werden.

Die Studien von Ko et al. [156], in denen Plasmaspiegel von Kaninchen nach nasaler Gabe TST enthaltender Emulsionen detektiert wurden, konnten zur Orientierung herangezogen werden: nach einer Gabe von 3,8 mg TST/Tier konnten absolute Bioverfügbarkeiten von ca. 40 - 50% ermittelt werden. Um diese Konzentrationsverhältnisse zu erreichen und damit eine Analytik mittels HPLC zu ermöglichen, müsste für die vorliegenden Studien bei einer Verteilung der Applikationsdosis auf maximal 5 Sprühstöße pro Tier (ein Sprühstoß ca. 50 µl) in der Ausgangslösung eine Konzentration von ca. 15 mg/ml vorliegen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des AD (vgl. Kap. 3.4.1) waren durch Lösen in den ME-Systemen sowie in einer 9%igen HP- γ -CD-Lösung AD-Konzentrationen im Bereich von 4 - 14 mg/ml (vgl. Kap. 4.1.4.2) zu erzielen. Der Vergleich mit einer Puffer-Referenzlösung konnte nicht durchgeführt werden, da EBS für AD lediglich eine Sättigungslöslichkeit von 66 µg/ml aufweist. Bei Verwendung von radioaktiv-markierten Substanzen können aufgrund einer sehr viel empfindlicheren Analytik deutlich geringere Mengen im Plasma detektiert werden. Diese Methode konnte jedoch wegen fehlender Voraussetzungen nicht zur Anwendung gelangen. Die ermittelten Plasmakonzentrationen sind in Abb. 14 über die Zeit aufgetragen. Ein Vergleich mit einer i.v.-Gabe des Arzneistoffs wurde nicht durchgeführt.

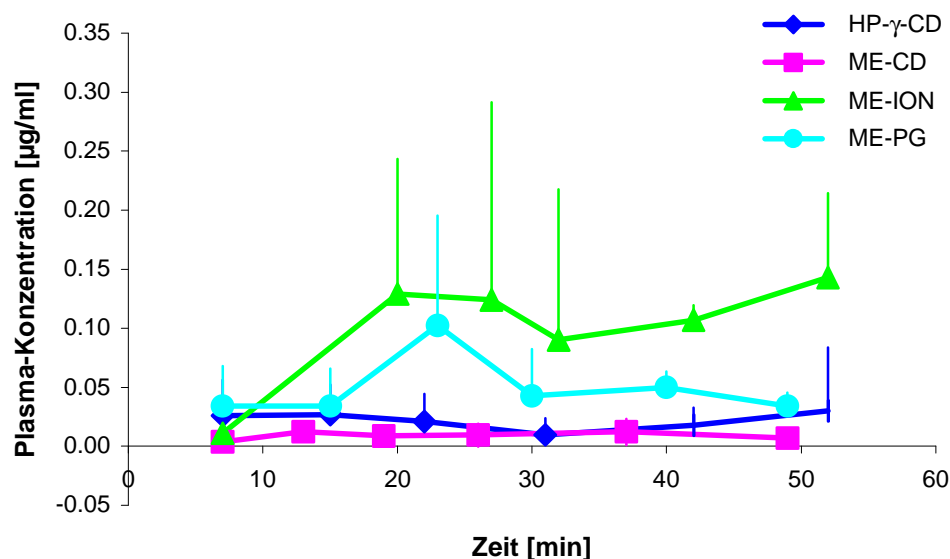


Abb. 14: Plasma-Zeit-Profile nach nasaler Applikation unterschiedlicher AD-Formulierungen an Kaninchen

Bei der Durchführung der Versuche stellte sich die Arzneistoffextraktion aus den Plasma-proben als äußerst problematisch dar. Die Wiederfindungsversuche (vgl. Kap. 5.2.12) konnten lediglich anhand von Schweineplasma durchgeführt werden und ergaben anfänglich im relevanten Konzentrationsbereich unrealistisch hohe Werte. Da vermutlich eine Assoziation von AD mit Plasma-Lipoproteinen [137] oder anderen Plasmapbestandteilen die hohen Konzentrationen verursachte, wurde versucht, durch eine zwischengeschaltete Festphasen-Extraktion (*solid phase extraction*, SPE) den Wirkstoff zu trennen [157, 158]. Aufgrund der aufwändigeren Analytik, die mit einem größeren Arzneistoffverlust einherging, und der maximal erlangten AD-Konzentrationen in den applizierten Formulierungen von lediglich 3,6 mg/ml für ME-PG, 5,7 mg/ml für ME-CD, 6,8 mg/ml für HP- γ -CD und 8,1 mg/ml für ME-ION, lagen die ermittelten Plasmakonzentrationen alle unterhalb der Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode (vgl. Kap. 5.2.1) und können daher lediglich zur Orientierung dienen. Möglicherweise wurde auch aus diesem Grund kein TST in den Proben gefunden; allerdings ist auch nicht unbedingt ein enzymatischer Umsatz der Substanz nach nasaler Gabe zu erwarten [153].

Die Zubereitungen ME-ION und ME-PG ergaben tendenziell höhere Plasmakonzentrationen als ME-CD und HP- γ -CD und wiesen ein Maximum nach ca. 20 min auf. Diese Ergebnisse korrelieren teilweise mit den oben erwähnten Messungen von Ko et al. [156], die Maxima nach 20 min sowie höhere Plasmaspiegel nach Verabreichung aus einer positiv oder negativ

geladenen Submikronemulsion gegenüber einer nicht ionischen Formulierung fanden. Stuenkel et al. [159] ermittelten ebenfalls Maxima bei 20 min für humane Plasmaspiegelnkurven von AD und TST nach Gabe von Sublingualtabletten.

Ein Vergleich mit den In-vitro-Permeationen aus Kap. 4.2.3.1 zeigt eine vorsichtige Übereinstimmung der Ergebnisse insofern, dass für Rindernasemukosa aus ME-PG ein tendenziell höherer P_{eff} gemessen wurde als aus HP- γ -CD. Das Resultat der ME-CD-Permeation war vergleichbar mit dem Wert aus ME-PG und ergibt somit keine Parallele zu den In-vivo-Studien. Die Zubereitung ME-ION wurde in vitro nicht getestet. Allerdings scheinen auch unter In-vivo-Bedingungen die einzelnen Trägersysteme möglicherweise individuelle Effekte auf die Arzneistoffresorption auszuüben, was sich bereits in den Permeations- sowie Penetrationsstudien (vgl. Kap. 4.2.3.1 und 4.3) in ähnlicher Weise abzeichnete. Einschränkend muss zu einem Vergleich der Permeations- und In-vivo-Studien angemerkt werden, dass die Plasmakonzentrationen nicht nur von der Arzneistoffabsorption, sondern ebenso von der Verteilung der Substanz im Organismus sowie deren Metabolisierung und Elimination abhängen.

In Gegenüberstellung zu der oben zitierten Arbeit von Ko et al. [156] fanden Hussain et al. [160] in ihren Studien eine 90 – 99%ige absolute Bioverfügbarkeit nach nasaler Gabe von radioaktiv markiertem TST in einer Tween 80/ Puffer-Lösung an Ratten. In einer weiteren Untersuchung ermittelte die gleiche Gruppe [4] nahezu identische AUC-Werte nach intravenöser bzw. nasaler Gabe eines TST-Prodrug (Testosteron-17 β -N,N-Dimethylglycinat-Hydrochlorid). Demnach ist auch für das lipophile AD eine relativ hohe Bioverfügbarkeit nach nasaler Applikation zu erwarten, sofern die Freigabe aus der Formulierung nicht der limitierende Faktor ist. Für HP- γ -CD und ME-CD ist aufgrund des Einschlusses in die CD-Kavität (vgl. Kap. 4.1.4.3) zumindest mit starker zeitlicher Verzögerung der Liberation zu rechnen, wofür auch die Daten in Abb. 14 sprechen, so dass möglicherweise der Abtransport der Formulierung vom Applikationsort schneller erfolgt als die Resorption des Arzneistoffs.

Zur Beurteilung der physiologischen Verträglichkeit der Formulierungen ist zu sagen, dass nach Applikation und am Versuchsende bei den Tieren keinerlei Reaktionen, wie Niesen, Ausfluss von Nasenschleim, erschwerte Atmung oder sonstige Verhaltensänderungen, die auf eine Beeinträchtigung der Nasenfunktion schließen lassen, zu beobachten waren. Es kann daher angenommen werden, dass die Zubereitungen gut verträglich sind, wobei weitere systematische Untersuchungen diese Annahme bestätigen müssen.

4.5 Biophysikalische Untersuchungen

Um die Kornea als Applikationsort und die neuen ME als Trägersysteme anwendungsbezogen zu charakterisieren, wurden weiterführende Versuche unternommen. Da AD am Auge als potentieller Wirkstoff beim Sicca-Syndrom diskutiert wird [10], ist die Wirkung der Trägerformulierung auf den Tränenfilm und vor allem auf die Lipidschicht des Tränenfilms von besonderem Interesse (vgl. Kap. 3.1.2). Darüber hinaus kann zur Behandlung der Symptome bei günstigen Effekten auch eine Anwendung der arzneistofffreien Formulierung indiziert sein. Um daher diese Wechselwirkungen näher zu untersuchen, erfolgten Messungen am Langmuir-Trog [91]. Hierbei können Oberflächenphänomene einer gespreiteten Substanz bzw. Interaktionen zwischen den Inhaltsstoffen der Subphase und dieser Substanz detektiert werden.

4.5.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Wie bereits in Kap. 3.1.2 beschrieben, ist der Tränenfilm des gesunden Auges mehrschichtig aufgebaut. Direkt auf dem Epithel der Hornhaut über eine Glykokalix verankert liegt die gelartige und widerstandsfähige Muzinschicht [21, 22]. Darüber folgt eine hydratisierende wässrige Schicht, und auf deren Oberfläche schwimmt abschließend eine Lipidschicht, die normalerweise ein Verdunsten des Tränenfilms verhindert. Die Bestandteile dieses Lipidfilms werden in den Meibom'schen Drüsen gebildet, die am unteren und oberen Lidrand verteilt sind, jeweils am Übergang von der Haut des äußeren Augenlides zum Konjunktiva-Epithel (Abb. 15).

Das Meibom'sche Drüsensekret (MGS) wird in den elastischen Drüsengängen gesammelt, durch den Lidschlag herausgedrückt und über den Augapfel verteilt [23, 161]. Dabei entsteht ein 8–10 nm dicker Film [162], der in der menschlichen Tränenflüssigkeit eine Konzentration von 131,2 µg/ml ausmacht [29].

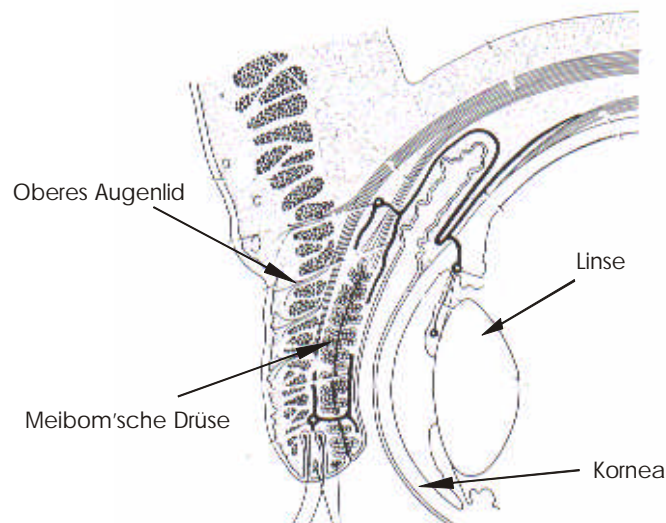


Abb. 15: Schematischer Querschnitt durch eine Meibom'sche Drüse im oberen Augenlid sowie durch den vorderen Augenabschnitt; nach [163]

Ist das Meibom-Sekret in seiner Menge oder Zusammensetzung verändert, hat das direkten Einfluss auf den gesamten Tränenfilm. Ein Aufreißen oder Fehlen der Lipidschicht wird als die mögliche Hauptursache für das Syndrom des „Trockenen Auges“ diskutiert, da unter diesen Bedingungen kein ausreichender Verdunstungsschutz für die darunter liegende wässrige Schicht mehr gegeben ist [164, 165]. Aus der Literatur konnten einige physikalisch-chemische Parameter des MGS entnommen werden, die in Tabelle 22 aufgeführt sind.

Tabelle 22: Physikalisch-chemische Parameter des MGS (vgl. auch Tabelle 1)

Brechungsindex	1,48 [166]
Viskosität bei 35 °C	9,7 – 19,5 Pa•s [23]
Schmelzbereich	19,5 – 32,9 °C [23]
Oberflächenspannung der Tränen	43,6 – 46,6 mN/m [27]

Bei der Wertung dieser Daten ist allerdings zu berücksichtigen, dass für die entsprechenden Messungen jeweils nur sehr geringe Mengen an Sekret zur Verfügung stehen und die statistische Absicherung schwierig ist. Da die MGS-Schicht ein aus einer Vielzahl an

Lipidkomponenten, hauptsächlich polare Wachse, Sterolester und Phospholipide [23], zusammengesetzter Monolayer [173] mit zum Teil oberflächenaktiven Eigenschaften ist [167, 168], lässt sie sich andererseits im Labormaßstab nicht zufriedenstellend synthetisieren. Gefragt sind also Messmethoden, die mit sehr geringen Mengen an Substanz reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Bei Versuchen am Langmuir-Trog können partiell die physiologischen Bedingungen am Auge nachempfunden werden, indem MGS als sehr dünner Film (Monolayer) auf eine wässrige Subphase aufgetragen und dann mit Hilfe einer beweglichen Barriere komprimiert und wieder expandiert wird. Für die Applikation (Spreitung) dieses Films sind nur sehr geringe Substanzmengen (ca. 10 –100 µg) erforderlich. In Abb. 16 ist der Vorgang der Komprimierung amphiphiler Moleküle eines Oberflächenfilms skizzenhaft dargestellt.



Abb. 16: Skizze eines Langmuir-Trogs: Amphiphile Moleküle vor (links) und nach (rechts) beendeter Komprimierung durch eine bewegliche Barriere

Kawaguchi [169] spreitete in seinen Versuchen zunächst die Gesamt-Tränen auf einer isotonen Pufferlösung im Langmuir-Trog. Dabei konnte durch Bestäuben mit Talkum ein Oberflächenfilm nachgewiesen werden, der Eigenschaften eines Monolayers zeigte.

Jaeger et al. [170] untersuchten MGS an einem automatisierten Langmuir-Trog und zeichneten simultan Oberflächendruck und –potential auf. Diese Versuche wurden von Kaercher et al. [171 - 174] weitergeführt und darüber hinaus optimiert, indem der Film während der Messung durch ein Brewsterwinkel-Mikroskop (*Brewster angle microscope*, BAM, vgl. Kap. 5.2.13) beobachtet wurde [175 - 177]. Im Rahmen dieser Studien wurden auch Versuche mit MGS von Patienten mit Keratoconjunctivitis sicca („Trockenes Auge“) bzw. Meibomitis durchgeführt [172, 177]. In beiden Fällen war eine Veränderung des Spreitverhaltens von MGS festzustellen.

Kritisch muss bei diesem Modell allerdings angemerkt werden, dass die physiologischen Mengenverhältnisse am Auge nicht simuliert werden und darüber hinaus der einzelne Lidschlag weitaus schneller erfolgt als die Kompression mittels der installierten Barriere. Jedoch können die Eigenschaften des MGS als Lipidfilm charakterisiert und Wechselwirkungen mit Formulierungsbestandteilen deutlich gemacht werden.

Weitere Anwendungsgebiete dieser Methode sind vor allem Strukturanalysen von Monolayern, bestehend beispielsweise aus Tensiden [178] oder Bestimmungen des Diffusionsverhaltens von Substanzen aus einer Subphase an die Oberfläche [179].

4.5.2 ERGEBNISSE

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der ME und ausgewählter Bestandteile auf das Meibom'sche Drüsensekret (MGS) untersucht, vor allem im Hinblick auf Anwendbarkeit dieser Trägersysteme am Auge. Dazu wurde MGS im Langmuir-Trog auf eine wässrige Subphase gespreitet, der jeweils die ME bzw. deren Einzelkomponenten (vgl. Tabelle 4) zugesetzt waren. Während der Messung wurden kontinuierlich Oberflächendruck (Schub, π [mN/m]) und $-\text{potential}$ [mV] aufgezeichnet. Darüber hinaus wurde die Oberflächenbeschaffenheit durch ein Brewsterwinkel-Mikroskop (BAM) beobachtet und über eine Kamera fixiert. Der Versuchsaufbau ist detailliert in Kap. 5.2.13 abgebildet und beschrieben.

Im Folgenden werden in erster Linie die detektierten BAM-Bilder interpretiert, da die beiden Parameter Schub und Oberflächenpotential bei komplex aufgebauten bzw. inhomogenen Oberflächenfilmen, wie sie in diesen Messungen zu erwarten waren, schwer auszuwerten sind. Alle Bilder zeigen den gleichen Flächenausschnitt, jedoch bei unterschiedlichem Komprimierungsgrad der Gesamtfläche, der jeweils in der Abbildungsbeschriftung angegeben ist. Eine Komprimierung von 100% bedeutet hier eine Verkleinerung der Fläche auf 115 cm², die aufgrund des Versuchsaufbaus maximal zu erreichen war (vgl. Kap. 5.2.13), eine Expansion von 100% analog dazu eine Fläche von 353 cm², was der Troggesamtoberfläche entspricht.

4.5.2.1 Spreitung von MGS auf Wasser/Puffer

Wie bereits berichtet (vgl. Kap. 4.5.1), haben Kaercher et al. [170 - 177] schon früher umfangreiche Untersuchungen an MGS im Langmuir-Trog durchgeführt, so dass hinsichtlich Methodik und informativer Abbildungen auf diese verwiesen werden kann. Zur Interpretation der hier durchgeführten Messungen werden jedoch zwei BAM-Bilder, die MGS auf Wasser bzw. auf EBS gespreitet zeigen (Abb. 17 und Abb. 18), wiedergegeben.

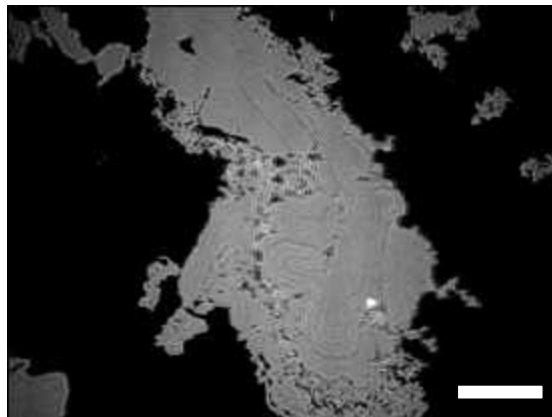


Abb. 17: MGS (10 µg) auf Wasser bei 76% Komprimierung ($A=173 \text{ cm}^2$)¹

Die Oberfläche der jeweiligen Subphase erschien in der Regel ohne gespreitetes Material in der BAM-Betrachtung gleichmäßig dunkel. Dies bedeutet jedoch nicht in jedem Fall, dass kein Oberflächenfilm vorhanden ist, sondern dass aufgrund der unzureichenden Filmdicke bzw. der Molekülanordnung keine ausreichende Reflexion des Laserlichts erfolgt. Erst bei einer Filmdicke über 2 nm wird das einfallende Laserlicht in ausreichender Intensität reflektiert.

In Abb. 17 ist eine MGS-Scholle zu sehen, die in lockeren oder etwas dichter gepackten Verbänden auf der dunkel erscheinenden Trogoberfläche schwamm. Selbst vollständige Komprimierung ergab in diesem Fall keinen gleichmäßig reflektierenden Film. Während der Komprimierung konnte zudem mittels BAM eine Drift der MGS-Schollen beobachtet werden, so dass angenommen werden muss, dass die dunklen Bereiche die unbelegte Subphasenoberfläche darstellen oder von einem sehr mobilen Film (gas-analog) belegt sind.

Abb. 18 dagegen zeigt einen sehr dichten, unbeweglichen MGS-Film, der nahezu den gesamten Bildausschnitt bedeckt und aufgrund seiner Dicke sehr hell erscheint. Die erhöhte Konzentration von 60 µg MGS führte also zur Bildung eines zusammenhängenden, homogenen Films. Diese Messung erfolgte auf EBS-Puffer als Subphase, um einen Elektrolyt-Einfluss auf die Filmeigenschaften festzustellen, der aber in diesem Fall und ebenso in weiteren Versuchen mit CrEL- und IPM-Filmen vernachlässigbar war, sowohl hinsichtlich der BAM-Bilder als auch der Daten von Schub und Oberflächenpotential.

¹ Der weiße Balken repräsentiert in allen folgenden BAM-Aufnahmen eine Länge von 100 µm.

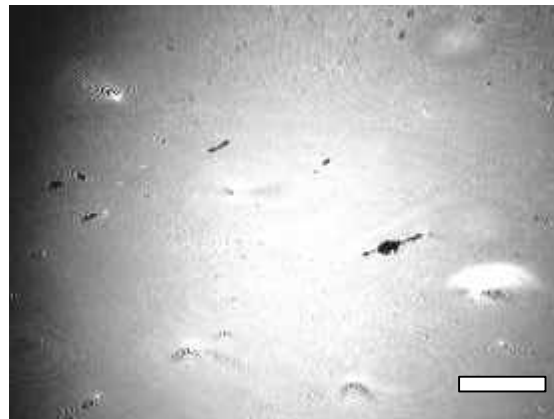


Abb. 18: MGS (60 µg) auf EBS bei 98% Komprimierung ($A=119 \text{ cm}^2$)

Der Einsatz einer derart niedrigen Konzentration (hier 10 µg), bei der sich kein homogener Film bildet (vgl. Abb. 17), ist genau genommen bei dieser Messanordnung zur Charakterisierung eines Oberflächenfilms nicht sinnvoll. Für die weiteren Versuche mit Adjuvantien hatte sich jedoch eine Konzentration von 10 µg MGS als ausreichend erwiesen, da Wechselwirkungen zwischen MGS und den verschiedenen Zusätzen zur Subphase untersucht werden sollten, die zum Teil einen starken Schubanstieg, gleichbedeutend mit einer Oberflächenbelegung, bereits zu Beginn der Messungen zur Folge hatten.

4.5.2.2 Subphasen-Zusatz: Cremophor[®] EL

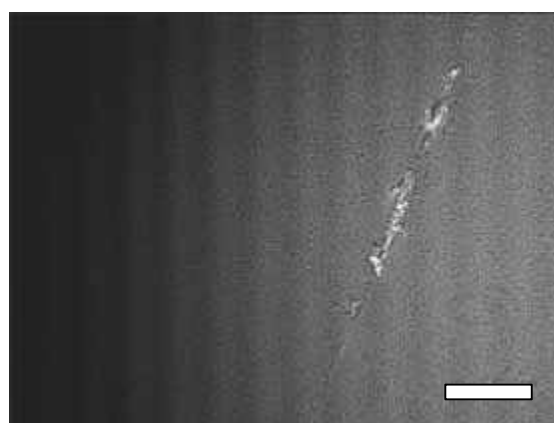


Abb. 19: MGS (10 µg) auf CrEL (0,1 % in Wasser) bei 29% Komprimierung ($A=284 \text{ cm}^2$)

Abb. 19 zeigt vermutlich einen MGS-Rest in einem dichten Film aus Lipiden des MGS und CrEL, das zu 0,1% im Wasser der Subphase gelöst wurde. Vor dem Applizieren des MGS erschien die Oberfläche der CrEL/Wasser-Subphase dunkel (s. oben!).

Um den Einfluss des CrEL auf den MGS-Film zu konkretisieren, wurden in einem anderen Versuch ohne BAM-Beobachtung 20 µg CrEL ($15,3 \cdot 10^{-6}$ mMol) auf Wasser aufgetragen und bei Komprimierung ein deutlicher Schubanstieg auf maximal 23 mN/m registriert (Daten nicht dargestellt). Dies lässt darauf schließen, dass bereits sehr geringe CrEL-Mengen unter den Versuchsbedingungen auf Wasser spreiten und einen Film auf der Subphase bilden. Dieses Ergebnis sowie die Oberflächenaktivität der Substanz ($36,33 \pm 0,02$ mN/m für eine 20%ige wässrige CrEL-Lösung) führen zu der Annahme, dass sich CrEL auch nach Lösen in der Subphase zu einem Teil an der Oberfläche anordnete, dabei aber kein ausreichend dicker Film entstand, der mittels BAM sichtbar war. Bei Aufspaltung von MGS konnten die Tensid-Moleküle mit den MGS-Lipiden in Wechselwirkung treten, und es entstand sofort ein dichter, sichtbarer Film, der aufgrund unzureichender Durchmischung vereinzelt noch MGS-Inseln aufwies (Abb. 19).

Der Verlauf der beiden Isothermen (Abb. 20) kann diesen Zusammenhang verdeutlichen. Der Kurvenverlauf von rechts nach links entspricht der Kompression des Films und der Verlauf zurück bis zum Ausgangspunkt der Expansion. Das Zurückfahren der Barriere erfolgte mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit, so dass die resultierenden unterschiedlichen Kurvenverläufe darauf zurückzuführen sein dürften.

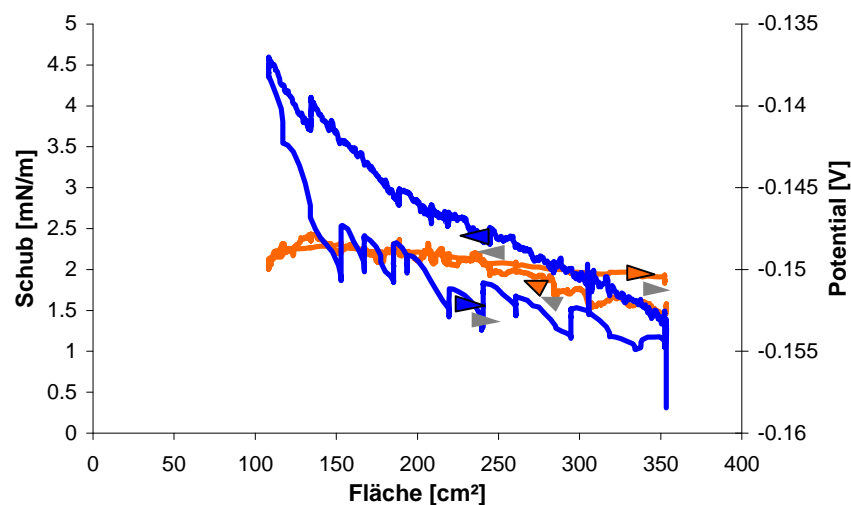


Abb. 20: Schub (blau) und Potential (orange) von MGS (10 µg) auf CrEL (0,1% in Wasser)

Bereits ohne Flächenänderung unmittelbar nach dem Einfüllen wurde ein Schub von 33 mN/m gemessen, der nahezu der Differenz aus den Oberflächenspannungen von Wasser (72,54 mN/m bei 21 °C) und CrEL (s. oben!¹) entspricht, aber aufgrund der Messanordnung (vgl. Kap. 5.2.13) nicht als absoluter Wert betrachtet werden darf. Jedoch kann dieses Ergebnis die Annahme unterstützen, dass sich die gelösten CrEL-Moleküle im Gleichgewicht mit CrEL-Assoziaten innerhalb der Subphase und an deren Oberfläche befinden. Dieser detektierte Ausgangspunkt wurde gleich Null gesetzt, so dass die durch Flächenänderung erhaltene Schub-Kurve vom Messwert 33 mN/m zum Ausgangswert 0 mN/m parallel verschoben ist.

Sofort nach dem Spreiten von MGS stieg der Schub sprunghaft um ca. 1,5 mN/m an (Abb. 20), was vermutlich durch die angesprochenen Interaktionen zwischen CrEL und MGS an der Oberfläche verursacht wird [180]. Im weiteren Verlauf stieg die Kurve vergleichsweise kaum an (20 µg CrEL auf Wasser bewirkte einen Schubanstieg von 23 mN/m; Daten nicht dargestellt). Es ist denkbar, dass bei Komprimierung CrEL-Moleküle und in Tensid-Mizellen eingeschlossenes MGS von der Oberfläche in die Subphase abtauchen und somit die Anzahl der Moleküle pro Fläche mehr oder weniger konstant bleibt.

Das Oberflächenpotential von MGS auf CrEL/Wasser zeigt insgesamt nahezu keine Veränderung (Abb. 20). Wie eingangs bereits erwähnt, sind diese Daten für die untersuchten Filme schwer zu interpretieren oder mit Werten aus der Literatur zu vergleichen. Beispielsweise fanden Jäger et al. [171] und Kaercher et al. [173] einen plötzlichen Anstieg des Oberflächenpotentials für MGS auf Wasser von ca. 200 mV, was bei den eigenen Versuchen nicht erfolgte. Sehr allgemein gesprochen, kann eine Änderung des Oberflächenpotentials eine Umorientierung der Moleküle des Oberflächenfilms bedeuten [171].

Aus diesen Untersuchungen lässt sich für die physiologischen Bedingungen ableiten, dass CrEL möglicherweise in der Lage ist, auf dem Auge einen Oberflächenfilm zu bilden, der eine etwas niedrigere Oberflächenspannung (36,33 mN/m, bestimmt für eine 20%ige wässrige Lösung) aufweist als der Tränenfilm (43,6 - 46,6 mN/m [27]). Da für den Tränenfilm des „Trockenen Auges“ ein leicht erhöhter Wert gemessen wurde (49,6 mN/m [27]), könnte eine Applikation des Tensids vorteilhaft sein. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das Tensid Lipide, die am Lidrand oder an den Öffnungen der Meibom-Drüsen haften, zu solubilisieren und auf der Augenoberfläche zu verteilen vermag.

¹ CMC für CrEL < 0,1% in Wasser (m/V)

4.5.2.3 Subphasen-Zusatz: Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin

Bei Vorliegen von 1% HP- γ -CD in der Subphase schien das darauf gespreitete MGS ebenfalls Wechselwirkungen einzugehen. Abb. 21 zeigt den Flächenausschnitt bei der gleichen Komprimierung wie in Abb. 19 für CrEL abgebildet.

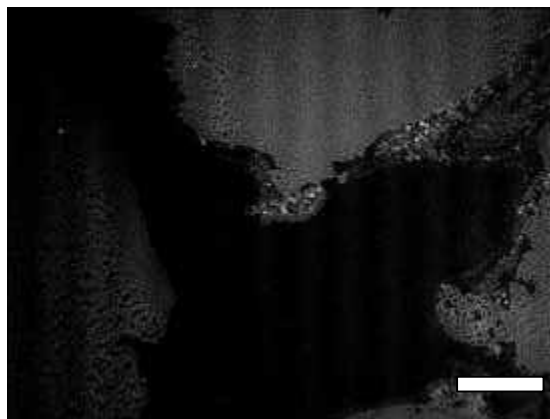


Abb. 21: MGS (10 μ g) auf HP-g-CD (1% in Wasser) bei 29% Komprimierung ($A=284 \text{ cm}^2$)

Im Fall von CD hat sich jedoch kein homogener Film gebildet, und es sind in der BAM-Aufnahme mindestens drei verschiedene Helligkeitsabstufungen erkennbar, die auf unterschiedliche Beschaffenheit oder Dicke des Oberflächenfilms hindeuten. Im Vergleich zu Abb. 17, die MGS (10 μ g) auf Wasser ohne Zusätze zeigt, erscheinen die Strukturen jedoch dunkler und lassen einen dünneren oder weniger dichten Film vermuten.

Im Verlauf der weiteren Komprimierung war jedoch zu beobachten, dass der Film mit seinen Inseln und Löchern in sich völlig unbeweglich war. Im Gegensatz zu den MGS-Schollen aus Abb. 17 haben sich die einzelnen Strukturen hier nicht weiter zusammengeschoben oder auf einander zu bewegt, während sie mit Hilfe der Barriere unter dem BAM vorbei geschoben wurden. Eine mögliche Erklärung könnte das Vorhandensein eines kaum reflektierenden, jedoch unbeweglichen, sehr dünnen Films sein, der die dunklen Bereiche ausfüllt. Kaercher et al. [176] kommen bei ihren Untersuchungen mit MGS von Patienten mit Meibomitis auf ein ähnliches Ergebnis. Eine andere Erklärung wäre, dass die Schollen ineinander verzahnt und verkantet waren und sehr steife, unbewegliche Filmbruchstücke darstellten. In ihrer Gesamtheit bildeten sie daher ein patchwork-artiges, zusammenhängendes Gerüst, das als Einheit von der Barriere auf der Subphase verschoben wurde.

Als Wechselwirkung kann hier ein völliger oder teilweiser Einschluss von Lipidkomponenten des MGS in die lipophile Kavität des CDs in Betracht gezogen werden. Für HP- β -CD und die nativen CD wird in der Literatur [58, 181] die Fähigkeit beschrieben, Lipide aus Membranen, vornehmlich Cholesterol und Phospholipide, zu extrahieren. Sowohl Cholesterol als auch Phospholipide sind im MGS nachgewiesen worden [23]. Es wäre daher vorstellbar, dass auch HP- γ -CD in der Lage ist, mit diesen Lipiden Inklusionen zu bilden und dadurch Wechselwirkungen der MGS-Lipide untereinander zu stören bzw. zu unterbinden. Möglicherweise ging damit eine strukturelle Auflockerung einher, die eine größere Ausdehnung auf der Subphase ermöglichte, worauf auch die dunklere Färbung der Schollen hindeuten könnte. Beim Zurückfahren der Barriere lösten sich die ursprünglichen MGS-Strukturen offensichtlich weiter auf und zeigten ein großflächiges Netz mit vereinzelt dunklen Bereichen (Abb. 22).

Diese auffallende Netzstruktur war bei MGS auf CrEL/Wasser (vgl. Kap. 4.5.2.2) sowie unter Zugabe von Mischungen aus CrEL mit HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD (vgl. Kap. 4.5.2.8) zur Subphase zu beobachten und trat jeweils bei nahezu vollständiger Expansion, nach zuvor erfolgter Kompression, auf.

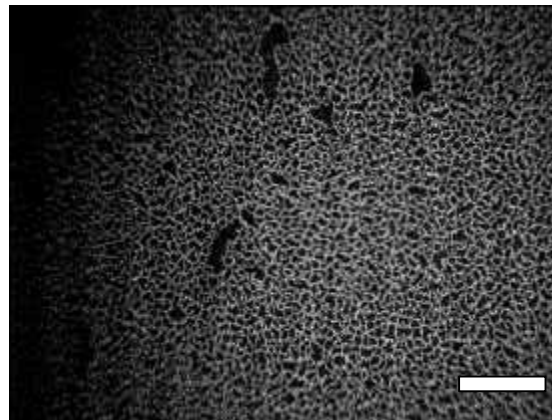


Abb. 22: MGS (10 μ g) auf HP- γ -CD (1% in Wasser) bei 80% Expansion nach erfolgter Kompression ($A=305 \text{ cm}^2$)

Nach erfolgter Kompression von 60 μ g MGS auf EBS (vgl. Abb. 18), also ohne weitere Formulierungskomponenten, war diese Netzstruktur ebenfalls zu beobachten, allerdings in weniger ausgeprägter Form. Es wäre daraus zu schlussfolgern, dass sich MGS-Komponenten lateral in bestimmter Art und Weise selbst assoziieren und die Ausbildung dieser netzartigen Struktur durch die Substanzen in der Subphase in gewisser Weise unterstützt, zumindest aber nicht behindert wird.

Bei Anwendung am Auge könnte die Ausbildung dieser „Netze“ für den Erhalt eines zusammenhängenden Lipidfilms vorteilhaft sein.

4.5.2.4 Subphasen-Zusatz: Hydroxytrimethylammoniopropyl- β -Cyclodextrin

Der Einsatz einer 1%igen HTAP- β -CD Lösung als Subphase schien im visuellen Vergleich wenig Einfluss auf die MGS-Strukturen an der Oberfläche zu nehmen. Abb. 23 zeigt MGS-Schollen, die im Erscheinungsbild sehr denen aus Abb. 17 für MGS/Wasser ähneln. Auffällig sind lediglich die stärker ausgefransten Randstrukturen, die bei nahezu allen beobachteten MGS-Schollen auf HTAP- β -CD auftraten und in diesem Bereich den netzartigen Strukturen aus Abb. 22 ähneln. Bei Kompression waren weder ein nennenswerter Anstieg von Schub oder Potential zu messen (Daten nicht dargestellt), noch traten bei Expansion die zuvor erwähnten, ausgeprägten Netzstrukturen auf. Es lässt sich schlussfolgern, dass sich wie bei MGS auf Wasser (vgl. Kap. 4.5.2.1) kein homogen reflektierender Film gebildet hat und in dieser Versuchsanordnung kaum Wechselwirkungen zwischen den MGS-Lipiden und dem HTAP- β -CD in der Subphase auftraten.

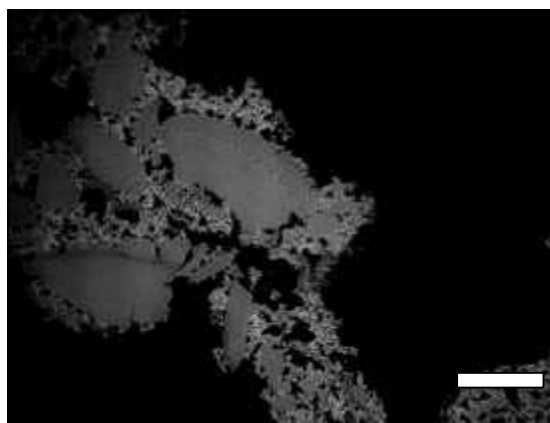


Abb. 23: MGS (10 µg) auf HTAP- β -CD (1% in Wasser) bei 50% Komprimierung ($A=233 \text{ cm}^2$)

HTAP- β -CD weist aufgrund der positiv geladenen Stickstoff-Gruppierungen in den nach außen gelegenen Seitenketten kationischen Charakter auf. Substituenten an den Seitenketten eines CD-Moleküls können in hohem Maße die Inklusion beeinflussen [182, 183]. Bei Seitenketten mit ionischem Charakter wurde in Abhängigkeit von ihrer Position zur Kavität eine Behinderung der Komplexbildung gefunden [60]. Sterische Hinderung und verminderte Inklusion in die β -Kavität können also für reduzierte Wechselwirkungen mit den MGS-Lipiden

verantwortlich sein. Allerdings müssen ionische Wechselwirkungen mit der Außenseite des CD-Moleküls aufgrund der entgegengesetzten Ladungen, z.B. in Phospholipiden des MGS, angenommen, werden wie schon für FSC diskutiert (vgl. Kap. 4.2.3.3).

Darüber hinaus weist HTAP- β -CD im Vergleich zu HP- γ -CD eine signifikant geringere Oberflächenaktivität ($51,45 \pm 0,42$ mN/m für HTAP- β -CD und $47,05 \pm 0,09$ mN/m für HP- γ -CD) auf, so dass sich in dieser Versuchsanordnung möglicherweise weniger HTAP- β -CD Moleküle an der Oberfläche der Subphase anreichern und in Wechselwirkung mit dem gespreiteten MGS treten können. Müller und Brauns [182] fanden für HTAP- β -CD eine vernachlässigbar geringe Oberflächenaktivität.

4.5.2.5 Subphasen-Zusatz: Propylenglykol

Bei Zugabe von 1% PG zur Subphase zeigten sich keinerlei schollenartige Strukturen wie sie beim Aufspreiten von MGS auf Wasser (vgl. Kap. 4.5.2.1) oder auf HTAP- β -CD/ Wasser (vgl. 4.5.2.4) zu sehen waren. Dagegen fielen sehr helle, stark reflektierende Punkte auf (Abb. 24), die mit dem Film unter dem Mikroskop vorbei geschoben wurden. Weiterhin waren sehr schwach - schattenhaft im Hintergrund - schaumartige Strukturen zu erkennen, die von einer nur schwach reflektierenden Substanz stammen müssen.

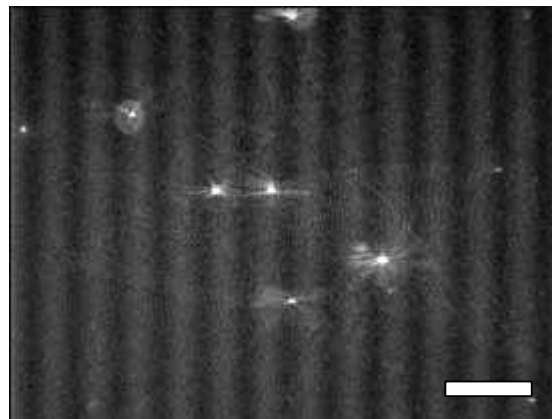


Abb. 24: MGS (10 μ g) auf PG (1,0% in Wasser) bei 95% Komprimierung ($A=127$ cm²)
(Das regelmäßige Streifenmuster ist bedingt durch die Bildbearbeitung.)

Möglicherweise hat PG aufgrund seiner lösungsvermittelnden Eigenschaften einzelne MGS-Bestandteile solubilisiert und das komplex zusammengesetzte Sekret sozusagen in Fraktionen mit hoher und geringer Reflexion aufgetrennt. Es ist denkbar, dass PG hydrophile Wechselwirkungen mit polaren Bereichen der Lipide eingeht, sich dadurch zwischen die

Moleküle lagert und so geordnete Strukturen aufbricht. Ein vergleichbares Verhalten wird auch als mögliche Funktion des Kotensids in einer ME diskutiert. Auf die MGS-Strukturen auf der Trogoberfläche hatte PG beim visuellen Vergleich der BAM-Bilder mit den CD einen sehr viel deutlicheren Einfluss.

4.5.2.6 Subphasen-Zusatz: Mikroemulsion ME-CD

Sehr interessante Strukturen ergaben sich bei der Zugabe der Formulierung ME-CD in 0,1%iger Konzentration zur Subphase. Von einer dicht gepackten, einheitlichen Filmschicht (Abb. 25) über zunehmend aufgelockerte Strukturen (Abb. 26 - Abb. 28) bis hin zu einem sich auflösenden „Schaumgebilde“ (Abb. 29) konnte über die gesamten Kompressions- bzw. Expansionszeit (45 min) hinweg eine Veränderung der Oberflächenstruktur beobachtet werden. Eine mögliche Ursache könnte eine zeitabhängige Strukturierung des Films, auch bereits ohne MGS-Spreitung, sein.

So untersuchten beispielsweise Glasgow et al. [179] im Langmuir-Trog die Änderung des Oberflächendrucks über mehrere Stunden hinweg, nachdem Tränen-Lipocaline¹ in eine Puffersubphase injiziert wurden, und fanden einen Anstieg des Oberflächendrucks nach einer „Ruhephase“ von ca. 30 min bis zum Erreichen eines Plateaus nach ca. 180 min.

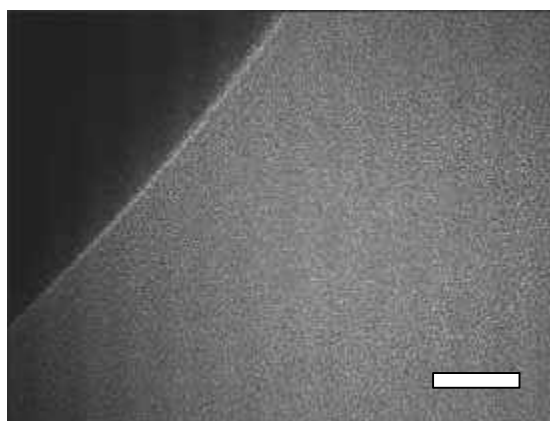


Abb. 25: MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1% in Wasser) bei 18% Komprimierung (A=310 cm²)

¹ Lipocaline sind Proteine, die in der Lage sind, kleine hydrophobe Substanzen zu binden und dadurch den Transport dieser Verbindungen im hydrophilen Milieu des Körpers zu ermöglichen. Diese Proteine kommen z.B. in der Tränendrüse oder der Nasenschleimhaut vor.

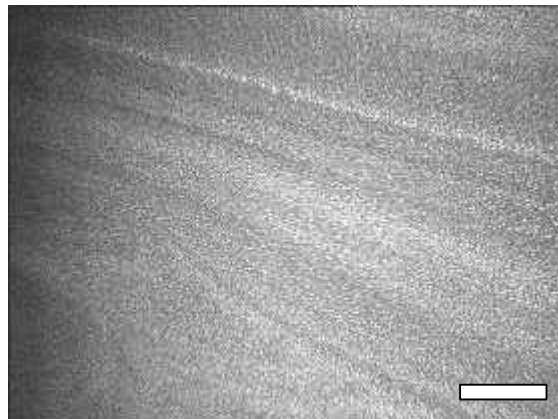


Abb. 26: MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1% in Wasser) bei 69% Komprimierung ($A=189 \text{ cm}^2$)

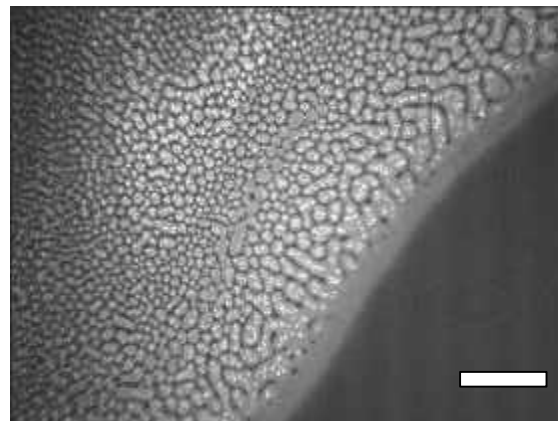


Abb. 27: MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1% in Wasser) bei 75% Komprimierung ($A=173,7 \text{ cm}^2$)

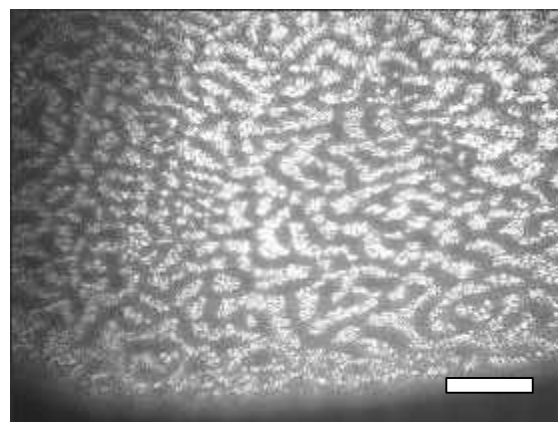


Abb. 28: MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1% in Wasser) bei 15% Expansion ($A=149,7 \text{ cm}^2$)

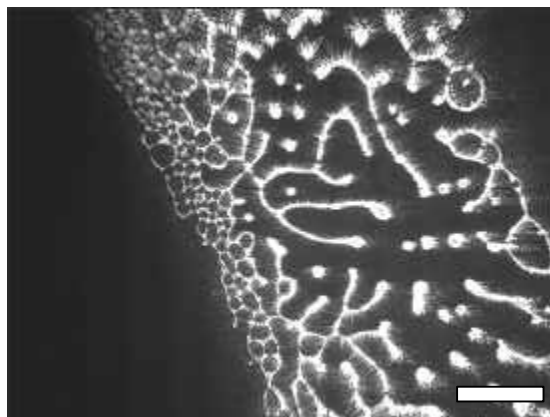


Abb. 29: MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1% in Wasser) bei 71% Expansion ($A=284 \text{ cm}^2$)

Prinzipiell ist für jeden Zusatz oberflächenaktiver Substanzen zur Subphase eine Gleichgewichtseinstellung in Abhängigkeit von der Diffusionsgeschwindigkeit und der Oberflächenaktivität der entsprechenden Substanz hinsichtlich ihrer Konzentration im Inneren der Subphase und an deren Oberfläche zu erwarten. Dieser Aspekt, der bei den Mehrkomponentensystemen, wie den ME, potenziert zum Tragen kommen kann, wurde in den vorliegenden Studien jedoch nicht entsprechend berücksichtigt, und alle Versuchsreihen wurden nach einer kurzen Ausgleichszeit von nur 5 min gestartet.

Der einheitliche Film am Anfang (Abb. 25) ähnelt im Aussehen dem MGS/CrEL-Film (Abb. 19). Auch der Verlauf der Isothermen (Abb. 30) ist mit der CrEL-Messung vergleichbar.

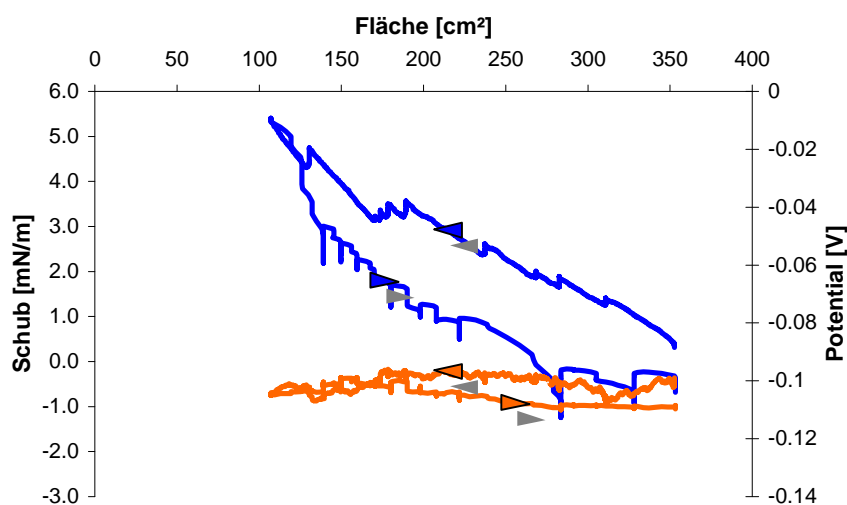


Abb. 30: Schub (blau) und Potential (orange) von MGS (10 µg) auf ME-CD (0,1%)

Da vermutlich durch das Lösen der ME-CD in Wasser die typischen ME-Strukturen zumindest teilweise verändert werden, ist auch hier eine Orientierung der freien CrEL-Moleküle an der Oberfläche anzunehmen und würde die Ähnlichkeiten mit dem MGS/CrEL-Film zu Beginn des Versuchs erklären.

Weiterhin enthält die ME die Fettkomponente IPM, die in der wässrigen Umgebung entweder durch Mizellen oder CD-Einschlussverbindung in Lösung gehalten wird oder sich an der Subphasenoberfläche anreichert. Bei hier nicht weiter dokumentierten Vorversuchen wurde ermittelt, dass IPM auf Wasser spreitet und bei Kompression im Langmuir-Trog einen Film bildet, der bei einer gespreiteten Menge von 80 µg einen maximalen Schub von 18 mN/m ergab.

In den Bildausschnitten ab Abb. 26 fallen helle Bereiche an der Oberfläche auf. Anhand des Erscheinungsbildes, wie sie den Film durchziehen, muss angenommen werden, dass es sich um eine mobile Phase handelt, die durch Strömungen auf der Oberfläche mitgenommen und verteilt wird. IPM, das bei Raumtemperatur flüssig ist, könnte möglicherweise durch Wechselwirkungen mit MGS-Komponenten diese Phase darstellen.

Beim Auftragen der MGS-Chloroform-Lösung auf die ME-CD enthaltende Subphase fand hier keine Spreitung statt, sondern die Lösung blieb als Linse auf der Oberfläche so lange liegen, bis das Chloroform abgedampft war. Das bedeutet, dass der Spreitungskoeffizient S_K^1 , der in diesem Fall die Differenz aus Oberflächenspannung der Subphase und Grenz- und Oberflächenspannung der Chloroformphase darstellt, negativ war. Das MGS konnte sich beim Auftragen also nicht spontan über die gesamte Oberfläche verteilen, sondern blieb als Bolus liegen, von dem ein zeitabhängiges Vermischen der Komponenten ausging, wodurch die inhomogene Reflexion des Films verursacht sein könnte.

In Abb. 27 ist eine deutliche Strukturierung der Oberfläche in eine Art Tröpfchen zu erkennen, in denen sehr helle Punkte auffallen, die in ihrer Verteilung dem in Abb. 26 erkennbaren Strömungsmuster folgen. Im weiteren Versuchsverlauf (Abb. 28) nahmen die hellen Strukturen zu und gleichzeitig die flächenmäßige Ausdehnung des reflektierenden Gesamt-Filmes ab. Wie Abb. 29 zeigt, nehmen nachfolgend die Strukturen nur noch einen geringen Teil der Bildfläche ein, obwohl die Expansionsoberfläche zu diesem Zeitpunkt eine

$$^1 S_K = g_S - (g_L - g_{LS})$$

γ_S : Oberflächenspannung der unteren Flüssigkeit; γ_L : Oberflächenspannung der spreitenden Flüssigkeit; γ_{LS} : Grenzflächenspannung zwischen den beiden Flüssigkeiten

Ausdehnung hat, die ungefähr die Hälfte der komprimierten Flächen aus Abb. 25 und Abb. 26 beträgt. Es scheinen also große Teile des anfänglich erkennbaren Films in die Subphase abzutauchen oder ihre Struktur derart zu verändern, dass die Reflexion abnahm und nicht mehr zu detektieren war. Allerdings bleibt der relativ hohe Schub (Anfangswert: 39 mN/m) nahezu unverändert (Abb. 30), was für einen vorhandenen, nicht reflektierenden Oberflächenfilm spricht.

Vollhardt und Fainermann [180] haben die Penetration einer amphiphilen Substanz aus der Subphase in einen bestehenden Monolayer untersucht und berechnet. Dabei fanden sie einen sprunghaften Anstieg des Schubs bei der Ausbildung eines Mischfilms und daran anschließend einen eher flachen Kurvenverlauf der Isotherme. Für die hier ermittelte Isotherme (Abb. 30) war ein schwacher Anstieg im Verlauf der Messung ebenso zu registrieren. Allerdings nutzten Vollhardt und Fainermann [180] für ihre Experimente einen unterschiedlichen Versuchsaufbau, in dem ein gespreiteter Monolayer mit Hilfe zweier Barrieren über eine tensidhaltige Subphase geschoben wurde.

Die BAM-Aufnahmen von Vollhardt und Fainermann [180] zeigen Bildung, Anwachsen und Koaleszenz kondensierter Phasen aus Monolayer und amphiphiler Substanz aus der Subphase. Die hier in Abb. 28 und Abb. 29 gezeigten Bilder weisen große Ähnlichkeit mit diesen Aufnahmen auf. Unklar bleibt allerdings, welche Substanz mit großer Reflexion die sehr hell erscheinenden Reststrukturen bildet. Sofern ein Bestandteil der ME dafür verantwortlich ist, wäre bei Erhöhung der ME-Konzentration in der Subphase möglicherweise eine Zunahme der Reflexion oder des Anteils dieser hellen Flächen an der Gesamtfläche zu erwarten. Um dies näher zu beleuchten, wurden nachfolgend Messungen mit 1% ME-CD in der Subphase durchgeführt.

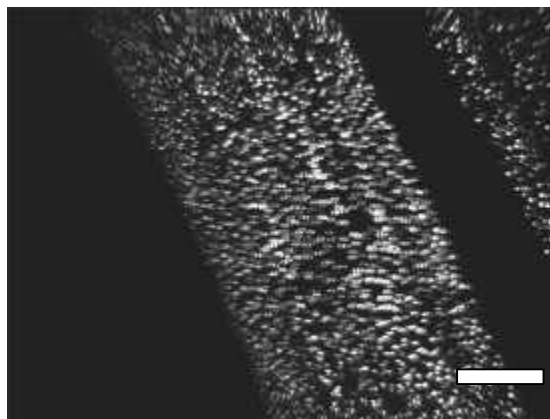


Abb. 31: MGS (10 µg) auf ME-CD (1,0% in Wasser) bei 66% Expansion ($A=272 \text{ cm}^2$)

Abb. 31 zeigt einen Oberflächenausschnitt bei einer Fläche von 272 cm² aus dem Versuch mit 1%iger ME-CD-Konzentration in der Subphase vergleichbar mit Abb. 29. Die hellen Strukturen scheinen hier tatsächlich dichter verteilt zu sein, wobei zu berücksichtigen ist, dass jeweils nur ein Flächenausschnitt gezeigt wird. Der spontane Schubanstieg nach Einfüllen der Subphase war hier etwas höher und erreichte einen Wert von 42 mN/m, im Gegensatz zu 39 mN/m bei 0,1%iger ME-CD. Der weitere Anstieg erfolgte bei der Kompression ebenfalls nur bis zum Maximum von 45 mN/m. Die dichter verteilten Strukturen ergaben also während der Kompression keinen größeren Schubanstieg.

Aufgrund der Ausbildung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Anordnung an der Oberfläche und Abtauchen in die Subphase, die zumindest für die amphiphilen Komponenten möglich ist, blieb vermutlich die Oberflächenbelegung bei beiden Konzentrationen nahezu gleich. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die dunklen Flächen bei diesen Messungen mit einem viel geringer reflektierenden Film belegt waren, der die Oberflächenspannung im Vergleich zur Oberflächenspannung von reinem Wasser deutlich reduzierte. Die beobachteten hellen Strukturen könnten von ME-Bestandteilen herrühren, die selbst keine Mizellen ausbilden und vielleicht erst zeitverzögert in Mizellen anderer Komponenten eingeschlossen wurden oder von besonders dichten und schlecht löslichen Assoziaten aus ME- und MGS-Komponenten.

4.5.2.7 Subphasen-Zusatz: Mikroemulsionen ME-PG bzw. ME-ION

Bei Zugabe von 0,1% ME-PG bzw. 0,1% ME-ION zur Subphase konnten keine so ausgeprägten Strukturen wie bei ME-CD beobachtet werden. In beiden Fällen zeigten sich aber Anfangsstrukturen wie für MGS auf ME-CD/Wasser in Abb. 25, die ohne die einzelnen für ME-CD abgebildeten Übergangsstufen (vgl. Abb. 25 - Abb. 29) nach der Expansion in sehr helle punkartige Reste übergingen. Abb. 32 veranschaulicht diese anfänglichen Oberflächenstrukturen am Beispiel von MGS auf 0,1% ME-ION in Wasser.

Ebenfalls für beide Zusätze vergleichbar ergab sich nach dem Spreiten des MGS ein leichter Schubanstieg von 2 mN/m und eine weitere Zunahme im Verlauf der Kompression um jeweils einen Betrag von 6 mN/m. Das Oberflächenpotential zeigte in beiden Fällen keine bemerkenswerte Veränderung während des Versuchs (Daten nicht dargestellt) und lässt damit wiederum keine Rückschlüsse auf mögliche Strukturänderungen der Oberflächenbelegung zu.

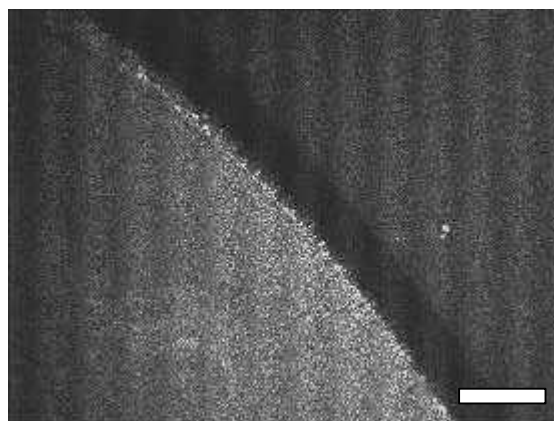


Abb. 32: MGS (10 µg) auf ME-ION (1,0% in Wasser) bei 33% Komprimierung (A=275 cm²)

Auch bei ME-PG und ME-ION wird für das im Langmuir-Trog beobachtete Verhalten hauptsächlich das Tensid CrEL als verantwortlich gesehen. Allerdings sollte das jeweilige Kotensid sowohl auf das CrEL als auch auf das gespreitete MGS ebenfalls einen Einfluss ausüben, wie in den vorangehenden Untersuchungen (vgl. 4.5.2.3 bis 4.5.2.5) ermittelt wurde. Für die drei ME konnten hier jedoch keine differenzierten Ergebnisse erzielt werden.

Darüber hinaus erfolgten Versuche mit einer Mischung aus CrEL und dem jeweiligen CD in gleicher prozentualer Zusammensetzung wie in ME-CD und ME-ION, die 1%ig der Subphase zugesetzt wurden, da insbesondere zwischen diesen Komponenten Interaktionen erwartet wurden. Hierbei waren mögliche Effekte der Fettkomponente IPM zu eliminieren.

4.5.2.8 Subphasen-Zusatz: Mischungen aus CrEL mit HP-γ-CD bzw. HTAP-β-CD

Bei der Spreitung von MGS auf einer 1%igen Lösung des Gemischs aus HP-γ-CD oder HTAP-β-CD mit CrEL, korrespondierend mit der Konzentration in den ME mit jeweils 9% CD und 20% (ME-CD) bzw. 15% CrEL (ME-ION) (vgl. Tabelle 4), waren mit CD-freier CrEL-Subphase vergleichbare Bilder zu beobachten (vgl. Abb. 19). Hervortraten mehrere Bereiche von unterschiedlicher Helligkeit sowie eine ausgeprägte Netzstruktur nach Expansion.

Da sich die beiden Subphasen weder im mikroskopischen Bild noch in ihren Isothermen deutlich unterschieden, muss auch hier das Tensid als dominierend hinsichtlich seiner Wirkung auf das MGS angenommen werden. Die CD begünstigen möglicherweise eine schnellere Auflockerung des Films oder eine Auftrennung der MGS-Komponenten, wie auch für PG diskutiert, wofür im Bild ggf. die unterschiedlich reflektierenden Bereiche sprechen könnten.

DeGrip et al. [184] haben in ihren Untersuchungen eine geringere Affinität verschiedener CD zu Phospholipiden als zu einer Reihe von strukturell unterschiedlichen Tensiden festgestellt und auf diese Weise Tensidreste aus Phospholipid-Liposomen extrahieren können. Alami et al. [90] untersuchten Strukturen von Komplexen zwischen einem nicht-ionischen, zweikettigen Tensid und hydroxypropyliertem α -, β -, und γ -CD und fanden stabartige oder sphärische Komplexe sowie ein Aufbrechen der Mizellstrukturen bei CD-Zugabe.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch bei den hier durchgeführten Versuchen entsprechende Wechselwirkungen zwischen CrEL und dem jeweiligen CD auftraten. Da das CD vorzugsweise Teile der hydrophoben Ketten des Emulgators inkludieren wird, könnte damit der amphiphile Charakter des Tensids abgeschwächt und eine Anreicherung im Inneren der Subphase begünstigt werden. Für die Oberflächenspannung einer Lösung aus beiden Komponenten wäre folglich ein Anstieg zu erwarten, was beim Vermessen mit dem Tensiometer bestätigt werden konnte (vgl. Kap. 4.1.3.2, Tabelle 6).

Eine weitere Folge der CD-Zugabe könnte ein Anstieg der CMC des Tensids sein, was von Topchieva und Karezin [185] für nicht-ionische Tenside und die nativen CD nachgewiesen wurde. Aufgrund des Überschusses an CrEL in den hier verwendeten Formulierungen und der sperrigen Struktur dieses dreikettigen Tensid-Moleküls (vgl. Kap. 3.5.1) ist allerdings anzunehmen, dass das Oberflächenverhalten im vorliegenden Fall durch die eventuell gebildeten „Komplexe“ nicht grundlegend beeinflusst wurde.

Unter physiologischen Bedingungen könnten diese Tensid/CD-Wechselwirkungen allerdings den Vorteil haben, eventuelle Tensid-Unverträglichkeiten abzumildern. Auch ist eine mögliche Membranschädigung des verwendeten CDs, bedingt durch Herauslösen von Lipidbestandteilen aufgrund der höheren Affinität des CDs zum Tensid, eher auszuschließen. Daran anknüpfend haben Jabbal Gill et al. [186] einen protektiven Effekt von CD gegen eine Membranschädigung durch andere Enhancer wie Laureth 9, Glykodoxycholat oder L- α -Lysophosphatidylcholin festgestellt.

4.5.2.9 Subphasen-Zusatz: Fertigarzneimittel liposic®

Um die Ergebnisse der durchgeführten BAM-Untersuchungen für einen möglichen Einsatz der ME-Systeme am Auge besser werten zu können, wurde zum Vergleich eine Lösung des auf dem Markt befindlichen Augengels liposic® (Dr. Mann Pharma, Berlin) als Subphase verwendet. liposic® ist zugelassen zur Behandlung des Trockenen Auges und enthält auf wässriger Basis mittelkettige Triglyceride als Fettkomponente. Den arzneilich wirksamen Bestandteil stellt Carbomer in einer Konzentration von 0,2% dar. Das Arzneimittel wurde zu

0,1% in Wasser gelöst, um als Subphase zu dienen. Eine höhere Konzentration war nicht verwendbar, da dann keine klaren Lösungen mehr entstanden; die Verdünnungen erschienen trüb und kamen für eine BAM-Untersuchung nicht in Frage.

Die BAM-Aufnahmen zeigten neue Strukturen (Abb. 33), die in den vorangegangenen Experimenten nicht beobachtet worden waren. An den Rändern fielen streifige Bereiche auf, die weder klar abgegrenzte Schollen darstellten noch einen geschlossenen Film bildeten. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass in diesem Fall bereits die Subphase allein eine deutliche Strukturierung auf dem Bildausschnitt erkennen ließ, was vermuten lässt, dass das liposic[®] auch in der eingesetzten Konzentration nicht einwandfrei gelöst war und somit bereits die Subphase allein das eintretende Laserlicht reflektierte.

Auch die in Abb. 33 auffallenden sehr hellen Punkte waren bereits auf der reinen Subphase zu erkennen. Aus der angegebenen Zusammensetzung des Handelspräparates geht nicht hervor, in welcher Weise die mittelkettigen Triglyceride in das wässrige Gel eingearbeitet wurden; ein Emulgator-Zusatz ist nicht aufgelistet. Insofern lassen sich auch die abgebildeten Strukturen nicht bestimmten Substanzen zuordnen.

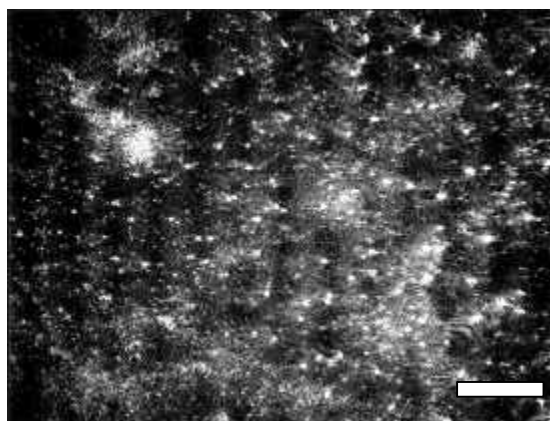


Abb. 33: MGS (10 µl) auf liposic[®] (0,1% in Wasser) bei 75% Komprimierung (A=174 cm²)

In Abb. 33 ist zu erkennen, dass der Bildausschnitt eine dreidimensionale Struktur zu haben scheint und die Strukturen schwimmen. Auch anhand der Graustufen ist nicht sicher zuzuordnen, welche Bereiche aus dem MGS stammen und welche die liposic[®]-Komponenten darstellen. Die Aufzeichnung der Isothermen brachte ebenfalls keine klare Aussage, da kein strukturierter Film gebildet wurde, der die Oberflächenparameter Schub und Potential beeinflussen konnte.

Im Unterschied also zu den ME-Systemen wurde im Falle des liposic®-Gels kein Oberflächenfilm gebildet. Dem MGS waren nach der Spreitung und während der Kompression auf den BAM-Bildern keine eindeutigen Strukturen mehr zuzuweisen.

Kapitel-Zusammenfassung

In diesen Modell-Versuchen sollten Wechselwirkungen der ME-Formulierungen sowie einzelner Komponenten daraus mit den Tränenlipiden (MGS) hinsichtlich Unterstützung der Funktion oder Ersatz des Lipidfilms [187] untersucht werden. Die getesteten Mikroemulsionen, ME-CD, ME-ION und ME-PG, könnten Vorteile für die Therapie des Sicca-Syndroms aufweisen und als mögliche arzneistofffreie oder auch –haltige Systeme Anwendung finden. Aus den durchgeführten Experimenten kann resümiert werden:

- HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD unterstützten beide die Ausbildung netzartiger Strukturen des MGS auf der Subphasenoberfläche, wodurch das Ausbilden eines zusammenhängenden Lipidfilms auf der Augenoberfläche, vor allem auch bei Meibomitis-Patienten, deren MGS eine veränderte, inhomogene, relativ starre Struktur aufweist [172, 177], erleichtert werden könnte.
- PG unterschied sich von den beiden CD deutlich, da hier mittels BAM keine Filmstrukturen auf der Oberfläche zu detektieren waren. Die charakteristische MGS-Struktur wurde durch diese Substanz vermutlich spontan zerstört.
- CrEL konnte als Film gespreitet werden und bildete aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften, vermutlich auch nach Lösen in der Subphase, einen Oberflächenfilm, der mit dem gespreiteten MGS interagieren konnte. Es wurde eine zeitliche Abhängigkeit festgestellt, da sich die Oberflächenstrukturen nur allmählich auszuweiten bzw. aufzulösen schienen.
- Bei Zugabe der drei ME-Systeme zur Subphase konnten keine differenzierten Ergebnisse detektiert werden. Allerdings werden vermutlich durch den starken Verdünnungseffekt die spezifischen ME-Strukturen zerstört, so dass bei Zugabe der Einzelkomponenten zur Subphase in analogen Konzentrationen vermutlich ähnliche Effekte zu erwarten sind. In diesen Untersuchungen war jeweils das oberflächenaktive CrEL in seiner MGS-Wechselwirkung dominant, so dass hinsichtlich der visuellen Auswertung ähnliche Ergebnisse wie unter alleinigem Tensid-Zusatz resultierten.
- Durch die hier beobachteten Interaktionen mit einer oder mehreren amphiphilen ME-Komponenten kann die Verteilung und ggf. Expression neuen Meibom-Sekrets erleichtert werden, indem neues MGS, was in den Drüsengängen der Meibom'schen

Drüsen gespeichert wird oder am Lidrand haftet, herausgelöst und durch den Lidschlag verteilt wird.

- Durch Wechselwirkungen zwischen den CD und dem Tensid in den ME-Rezepturen können möglicherweise die jeweiligen Einzel(neben)wirkungen abgeschwächt und damit die Verträglichkeit der Formulierung verbessert werden. Zudem könnte bei Applikation von ME-CD oder ME-ION ein Aufrechterhalten der dreischichtigen Struktur des Tränenfilms mit aufliegendem Lipidfilm begünstigt sein.
- Der Einzeleffekt des PG kam in der Formulierung ME-PG nicht mehr zum Tragen, was ebenso wie im Falle der CD sowohl die physiologische Verträglichkeit als auch die tränenfilmstabilisierende Wirkung der Formulierung im Vergleich zur Einzelkomponente optimieren könnte.
- Das Fertigarzneimittel liposic® zeigte ähnliche Effekte wie PG und führte spontan zum Auflösen der MGS-Strukturen. In diesem Fall wäre eher zu erwarten, dass die physiologische Tränenfilmstruktur zerstört wird und aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Zubereitung im Falle einer Anwendung mit deutlicher Sichtbehinderung zu rechnen ist.
- Die beobachtete zeitliche Verzögerung des MGS-Lösungsprozesses durch die drei ME sowie CrEL könnte vorteilhaft sein, da die Verweildauer einer applizierten Formulierung auf der Augenoberfläche in der Regel nur wenige Minuten beträgt.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Substanzen

Arzneistoffe

- | | |
|------------------|--|
| • Androstendion | Schering AG, Berlin |
| • Testosteron | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| • Fluorescein-Na | Merck, Darmstadt |

Cyclodextrine

- | | |
|--|-------------------------------------|
| • Hydroxypropyl- γ -CD | Wacker Chemie, München ¹ |
| • Hydroxytrimethylammoniopropyl- β -CD | Wacker Chemie, München |

Hilfsstoffe für die Mikroemulsionen

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| • Cremophor [®] EL | Caesar & Loretz, Hilden |
| • Isopropylmyristat | Caesar & Loretz, Hilden |
| • Propylenglykol | Wasserfuhr, Bonn |
| • Methylenblau (Löffler's) | E. Merck, Darmstadt |
| • Oil Red O | Serva Entwicklungslabor, Heidelberg |

HPLC-Fließmittel

- | | |
|---------------------------------------|---|
| • Acetonitril (HPLC grade) | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| • Methanol (LiChrosolv [®]) | E. Merck, Darmstadt |
| • Wasser | Reinstwasser (RS 90-4 UF, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Hamburg-Barsbüttel) |

Substanzen für die In-vivo-Studien

- | | |
|--------------------------|--|
| • Ursotamin [®] | Wirkstoff: Ketamin-HCl
Serumwerk Bernburg AG |
| • Rompun [®] 2% | Wirkstoff: Xylazin-HCl
Bayer Vital GmbH, Leverkusen |

¹ Der Firma Wacker Chemie, München sei an dieser Stelle für die kostenlose Überlassung der CD-Muster gedankt.

- | | |
|----------------------------------|---|
| • Liquemin® N 25000 | Wirkstoff: Heparin-Na, 5.000 I.E./ml
Roche |
| • Na-EDTA | Isocomerz, Herzberg |
| • Isoton. NaCl-Lösung | Delta Pharma, Pfullingen |
| • Methyl-tert. Butylether (MTBE) | J.T. Baker, Deventer, Holland |

Pufferlösung und weitere Chemikalien

Zusammensetzung Earl's Balanced Salts pH 7,4¹ (EBS)

CaCl ₂ •2H ₂ O	0,265 g/l
MgSO ₄ (wasserfrei)	0,0977 g/l
KCl	0,4 g/l
NaCl	6,8 g/l
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	0,122 g/l
D-Glucose	1,0 g/l
NaHCO ₃	2,2 g/l

Verwendete Elektrolyte:

- | | |
|-------------------------------|--|
| - Calciumchlorid | E. Merck, Darmstadt |
| - Magnesiumsulfat | E. Merck, Darmstadt |
| - Kaliumchlorid | Ferak Laborat, Berlin |
| - Natriumchlorid | Wasserfuhr, Bonn |
| - Natriummonohydrogenphosphat | Laborchemie, Apolda |
| - D-Glucose | E. Merck, Darmstadt |
| - Natriumbicarbonat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| - Salzsäure (0,1 N) | E. Merck, Darmstadt |
| - Natriumhydroxid (0,1 N) | Chemapol, Prag |
-
- | | |
|---|-------------------------------|
| • Chloroform | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| • Carbogen (CO ₂ /O ₂ 5:95) | Air Liquide GmbH, Düsseldorf |
| • n-Octanol | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| • Trichloressigsäure | E. Merck, Darmstadt |

¹ Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mittels 0,1 N HCl- oder NaOH-Lösung.

5.2 Methoden

5.2.1 GEHALTSBESTIMMUNGEN

5.2.1.1 Androstendion und Testosteron

Es wurde eine HPLC-Methode [74] genutzt, die eine parallele Bestimmung beider Substanzen, AD und TST, erlaubt. In nachfolgender Tabelle 23 sind die Methoden- und Geräteparameter aufgelistet.

Tabelle 23: Parameter der HPLC-Analytik für AD und TST

<i>Pumpe</i>	Intelligent Pump L-6200, Merck-Hitachi, Darmstadt
<i>Detektion</i>	L-4000 UV Detector, Merck-Hitachi, Darmstadt bei 240 nm
<i>Injektion</i>	Rheodyne, Cotati, CA, USA 20 µl Injektionsvolumen
<i>Autosampler</i>	Merck-Hitachi, Darmstadt
<i>Säule</i> <i>Vorsäule</i>	LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 125-4, Merck, Darmstadt LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 4-4, Merck, Darmstadt
<i>Mobile Phase</i>	60% Acetonitril, 40% Wasser
<i>Fließgeschwindigkeit</i>	1,0 ml/min

Die Nachweisgrenze für die beiden Substanzen lag < 40 ng/ml und die Bestimmungsgrenze betrug 0,5 µg/ml.

5.2.1.2 Fluorescein

FSC wurde am Fluorimeter (RF 5001 PC, Shimadzu, Japan) nachgewiesen. Die Messungen erfolgten bei einer Extinktion von 492 nm, wobei sich eine Emissionswellenlänge von 511 nm ergab. Die Bestimmungsgrenze dieser Methode lag bei 0,095 ng/ml.

5.2.2 HERSTELLUNG DER MIKROEMULSIONEN

Alle untersuchten Systeme (Zusammensetzung s. Tabelle 4) wurden auf die gleiche Weise hergestellt. IPM und CrEL wurden zusammen unter Rühren und Erwärmen auf 75 °C (Magnetrührer, RCT B, IKA Labortechnik Staufen, Janke&Kunkel GmbH&CoKG, Staufen) gemischt. Unter identischen Bedingungen wurde eine Lösung des jeweiligen Kotensids (HP- γ -CD, HTAP- β -CD bzw. PG) in Wasser hergestellt, die daraufhin unter fortgesetztem Rühren und Temperieren (75 °C) in die Lipid/Tensid-Mischung gegeben wurde. Alle Systeme zeigten direkt nach dem Vermischen eine leichte Trübung, die bei Erreichen von RT verschwand. Eine Einarbeitung von Arzneistoff erfolgte durch Lösen in der wässrigen Kotensid-Lösung vor der Zugabe zur Lipid/Tensid-Mischung.

5.2.3 FÄRBE-METHODE

Auf einem Uhrglas wurden jeweils drei Tropfen der zu prüfenden ME aufgebracht. An den Rand wurden daraufhin nacheinander zwei Tropfen der jeweiligen Farbstofflösung gegeben und vorsichtig mit einem Glasstab mit der ME vermischt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde die zu untersuchende ME auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die jeweilige Farbstofflösung wurde seitlich mit Zellstoff eingezogen und das Mischverhalten unter dem Mikroskop (Olympus CH2, Olympus Optical, Co Ltd., Japan, Vergrößerung 10fach bzw. 40fach) beobachtet. Zur Betrachtung der Mischung wurde das Deckgläschen vorsichtig abgehoben und die Zubereitung homogen mit dem Farbstoff vermischt. Es wurden für beide Methoden Löfflers Methylenblaulösung für die Mikroskopie sowie eine 1%ige Lösung von Oil Red O in IPM verwendet.

5.2.4 POLARISATIONSMIKROSKOPIE

Die Bestimmung der optischen Isometrie der ME-Systeme erfolgte an einem Polarisationsmikroskop (Laborlux 12 Pol S, Leica Mikroskopie Systeme GmbH, Wetzlar). Die Proben wurden auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckgläschen abgedeckt und im polarisierten Licht betrachtet.

5.2.5 PHYSIKALISCH-CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.2.5.1 Viskosität

Die Viskositätsbestimmungen wurden am Ubbelohde-Viskosimeter (Schott-Geräte, 6238 Hofheim) im Automatikbetrieb durchgeführt. Nach dem Temperieren der Probe im Wasserbad bei $25\text{ °C} \pm 0,1$ (Thermostat CT 1450 und AVS 350, Schott, Hofheim) wurde mindestens fünfmal die Durchflusszeit durch eine geeignete Kapillare bestimmt und unter Einbeziehung der Gerätekonstante die kinematische Viskosität ν erhalten. Mittels der Dichte ρ (s. Kap. 5.2.5.2) ließ sich aus diesem Wert die dynamische Viskosität η berechnen.

5.2.5.2 Dichte

Für die Bestimmung der Dichte wurde das Density meter DMA 38 der Firma Anton Paar KG, Graz, Österreich, verwendet. Die Proben wurden vor der Messung durch das Gerät auf 25 °C temperiert. Jede Probe wurde dreimal vermessen.

5.2.5.3 pH-Wert

Die Messung des pH-Werts erfolgte am pH-Meter 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH&Co, Berlin) bei RT.

5.2.5.4 Brechungsindex

Der Brechungsindex wurde an einem Abbé-Refraktometer (Carl-Zeiss-Jena, Jena) gemessen. Die Bestimmung erfolgte dreifach bei RT.

5.2.5.5 Tonizität

Die Messungen des osmotischen Drucks [mOsmol/kg] wurden mit einem automatischen Halbmikro-Osmometer (Knauer GmbH, Berlin) durchgeführt. Jede Probe wurde dreifach vermessen. Das Gerät wurde regelmäßig mit destilliertem Wasser (0 mOsmol/kg) und einer 1,2687%igen NaCl-Lösung (400 mOsmol/kg) kalibriert.

5.2.5.6 Oberflächenspannung

Für die Bestimmung der statischen Oberflächenspannungen [mN/m] wurde ein Ring-Tensiometer (TE 1C, Lauda, Lauda-Königshofen) verwendet. Alle Messungen ($n = 5$) erfolgten mittels eines Platin-Iridium-Rings bei RT.

5.2.5.7 Dielektrizitätskonstante

Die Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten wurde am DK-Meter Typ GK 68 (MLW-Prüfgeräte, Karl-Marx-Stadt) durchgeführt. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mit folgenden Kalibrier-Flüssigkeiten (Laborchemie, Apolda): Cyclohexan, Chlorbenzol, Acetophenon, Methanol, Aceton, 1,2-Dichlorethan, 1,4-Dioxan/Wasser 3:7 bzw. 2:8 und gereinigtem Wasser. Die Messungen wurden durchgeführt bei einer Temperatur von $20\text{ °C} \pm 0,5$.

5.2.6 KALORIMETRISCHE MESSUNGEN

Die kalorimetrischen Messungen wurden an einem Wärmestrom-Differenz-Kalorimeter (SETARAM C80D, Caluire Cedax, Frankreich) durchgeführt.

Für die Untersuchungen an ME-CD wurde mit einer Umkehrmischzelle gearbeitet, in deren inneren Zylinder 0,3 g einer Mischung aus 20% CrEL und 5% IPM gefüllt wurde und deren äußerer Zylinder 0,9 g einer wässrigen Lösung von 7, 9 bzw. 11% HP- γ -CD, ggf. unter Zusatz von 0,0025% AD, enthielt. Zur besseren Durchmischung wurden beiden Zellen Glaskugeln zugefügt. Nach Erreichen der Versuchstemperatur von $40\text{ °C} \pm 0,5$ wurde die Schwenkvorrichtung aktiviert und der Mischungsvorgang begonnen. Nach erneutem Erreichen der Basislinie konnte die Messung beendet werden. Die Vergleichszelle enthielt Luft. Die Auswertung erfolgte durch Integration der Fläche unter der Wärmestromkurve mittels gerätezugehöriger Software.

Die Untersuchungen zur Komplexierung von AD durch HTAP- β -CD wurden im Scanning-Betrieb mit einer Heizrate von 2,5 K/min über eine Temperaturspanne von 30-300 °C durchgeführt unter Verwendung der Normalzelle mit Glaseinsatz. Folgende Zubereitungen wurden vermessen:

- HTAP- β -CD
- AD
- 28,64 mg AD ($1 \cdot 10^{-4}$ Mol) und 334,0 mg HTAP- β -CD ($2 \cdot 10^{-4}$ Mol) gelöst in Wasser und gefriergetrocknet sowie als trockene Verreibung

Die Einzelsubstanzen wurden zuvor getrocknet (RT, Exsikkator). Die physikalische Mischung wurde in einem Porzellanmörser unter ständigem Verreiben und Abschaben hergestellt. Um eine Inklusion des AD zu erreichen, wurde eine Lösung aus AD und HTAP- β -CD in Wasser hergestellt (s.o.!) und bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 27 mbar gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4, Christ Medizinischer Apparatebau, Osterode/Harz). Jede Probe wurde so bemessen, dass in jedem Fall 5 mg AD enthalten waren. Die Auswertung der Peaks erfolgte mittels gerätezugehöriger Software.

5.2.7 RÖNTGENKLEINWINKELSTREUUNG

Die Röntgenkleinwinkelmessungen wurden mit einer Kratky-Kamera (A-8054, Anton Paar, Österreich) durchgeführt. Die Streumuster wurden auf Fotoplatten (BAS III, Fuji) erhalten und mit einem Scanner (MAC Science Dip-Scanner IPR-420) eingelesen.

5.2.8 VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

Hier wurden die Verteilungskoeffizienten für AD und FSC zwischen Oktanol bzw. IPM und EBS sowie der Einfluss der zugefügten Kotenside bestimmt. Nach vorheriger Absättigung des Oktanols bzw. IPM mit EBS wurden jeweils 2 ml der lipophilen Testphase mit dem gleichen Volumen an wässriger Substanzlösung (25 $\mu\text{g/ml}$) zusammengegeben und bei RT mind. 2 h auf einem Schütteltisch (Thys 2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau) geschüttelt.

Für die Bestimmung der VK der Wirkstoffe in EBS musste die Versuchsdurchführung modifiziert werden, da bei einem Konzentrationsverhältnis der lipophilen zur hydrophilen Phase von 1:1 (jeweils 2 ml, s.o.!) ein vollständiges Auflösen in einer der beiden Phasen, je nach Substanzcharakter, erfolgte. Es wurden 1 ml lipophile Phase mit 5 ml wässriger Phase für die AD-Bestimmung und umgekehrt 5 ml Ölphase mit 1 ml wässriger Lösung im Falle des FSC bei gleichbleibender Substanz-Konzentration kombiniert.

Nach Beenden des Schüttelvorgangs wurden die Ansätze 10 min bei 2.500 min^{-1} zentrifugiert (Labor-Zentrifuge, Z230, B. Hermle AG, 7209 Gosheim) und der wässrigen Phase 500 μl Probe entnommen. Der Substanz entsprechend wurde der Gehalt vor und nach der Verteilung an der HPLC (AD) bzw. am Fluorimeter (FSC), wenn nötig nach vorangehender Verdünnung, bestimmt (vgl. Kap. 5.2.1). Die Berechnung des VK erfolgte nach folgender Gleichung:

$$VK = \frac{V_w \cdot (c_w^0 - c_w^1)}{V_L \cdot c_w^1}$$

V_w : Volumen der wässrigen Phase; V_L : Volumen der öligen Phase; c_w^0 : Ausgangskonzentration der Substanz in der wässrigen Phase; c_w^1 : Endkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase

5.2.9 SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEIT

Der Arzneistoff wurde der jeweiligen zu untersuchenden Lösung im Überschuss zugegeben und in einem Bioinkubator (3032 GFL, Gesellsch. f. Labortechnik mbH, Burgwedel) bei 25 °C über 48 h geschüttelt. Die ungelöste Substanz wurde durch Filtration (Cellulosenitrat-Filter, Porengröße 0,2 µm, Sartorius GmbH, Göttingen) abgetrennt und das Filtrat mit Acetonitril in den Messbereich verdünnt. Um das Erreichen der Sättigungskonzentration zu überprüfen, wurden jeweilige Parallelansätze unter gleichen Bedingungen weitere 24 h geschüttelt und in gleicher Weise aufgearbeitet. Der Arzneistoffgehalt wurde mittels HPLC bestimmt (vgl. Kap. 5.2.1.1). Die Sättigungskonzentration war bei allen Proben bereits nach 48 h erreicht, da die Konzentrationen nach 72 h in keinem Fall signifikant höher lagen. Jeder Ansatz umfasste 4 Proben.

Die Erstellung der Löslichkeitsisothermen (Abb. 12) mit den CD erfolgte wie oben beschrieben bei CD-Konzentrationen von jeweils 0,1; 1; 2; 5; und 10%.

5.2.10 IN-VITRO-PERMEATIONSSTUDIEN

Zur experimentellen Ermittlung der Membranpermeation stehen zahlreiche Permeationsmodelle zur Verfügung. Viele davon sind dem Versuchsaufbau entsprechend modifiziert, basieren aber auf etablierten Systemen, wie zum Beispiel der Ussing-Kammer [53, 111, 127, 188], den Side-Bi-Side-Zellen [117] oder der Franz-Zelle, wobei letztere hauptsächlich für transdermale Permeationsstudien genutzt wird [189 - 191]. Allen Modellen gemeinsam ist die Möglichkeit zur Temperierung der Kammern, ggf. zur Durchmischung der Kompartimente sowie zur Probenentnahme aus der Akzeptorkammer.

In dieser Arbeit fand das Modell einer Ussing-Kammer aus Acrylglas (Grünberg Kunststoffe, Rödermark), die zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde [128], Anwendung. Um das Einspannen sowohl der gewölbten und dicken Kornea als auch der planen und dünnen

Mukosa möglich zu machen, wurde die Kammer weiter modifiziert. Abb. 34 zeigt den Aufbau der in dieser Arbeit entwickelten In-vitro-Permeationsmodelle für Kornea bzw. für Mukosa.

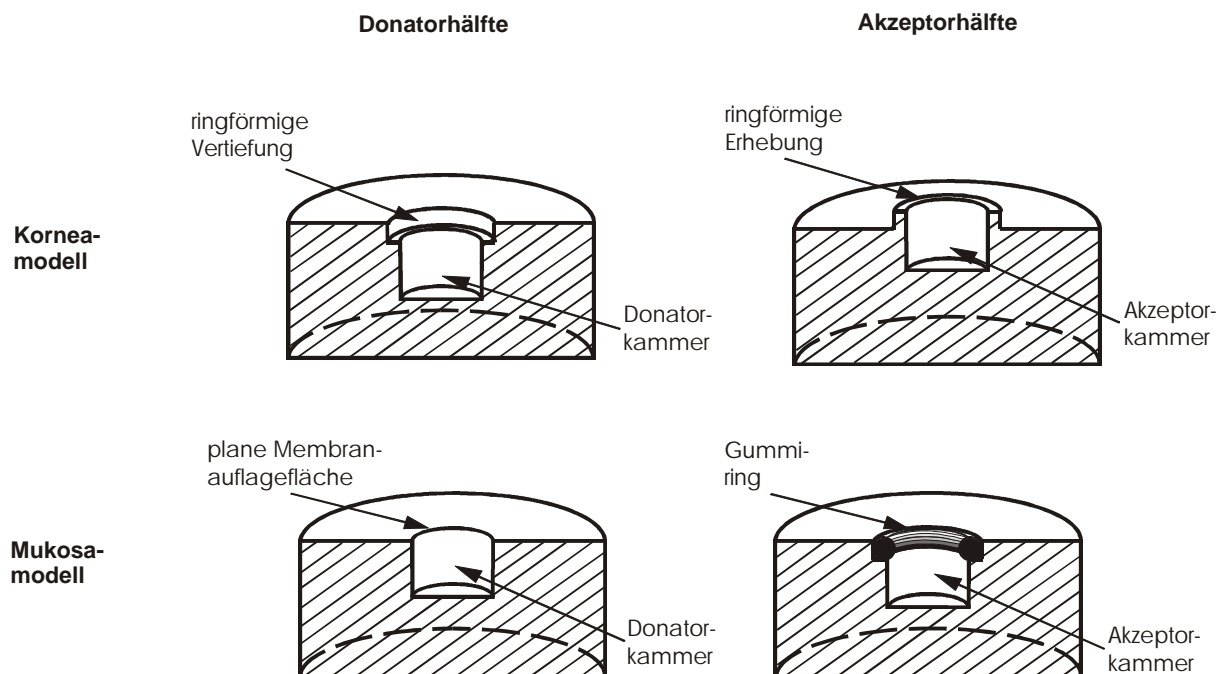


Abb. 34: Skizze der Permeationszellen: Querschnitt durch den Mittelpunkt, nicht maßstabgetreu

Für die Kornea-Studien befindet sich an der Öffnung der Akzeptor-Kammer ein ringförmiger Wulst, der in eine Vertiefung auf der Donator-Seite greift (Abb. 34, oben rechts und links) und die physiologische Wölbung der Kornea aufrecht erhält. Im Falle der Mukosa-Versuche ist der Wulst ersetzt durch einen Dichtungsring aus Gummi und die Vertiefung um die Donator-Öffnung egalisiert (Abb. 34, unten rechts und links), so dass beim Zusammensetzen der beiden Kammern der Gummiring schonenden Druck auf die Membran ausübt und das System abdichtet. Beide Kammer-Modelle sind baugleich mit einem Donator- bzw. Akzeptorvolumen von jeweils 1,0 ml und einer Permeationsfläche von 0,5 cm².

Die Studien wurden durchgeführt in einem Bioinkubator (3032, GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel), in dem die Kammern bei 33 °C ± 0,5 temperiert und durch horizontale Rotation mit 100 min⁻¹ bewegt werden konnten. In regelmäßigen Zeitabständen gemäß Tabelle 24 wurden der jeweiligen Akzeptorkammer 400 µl Probe entnommen und sofort mit frischer, temperierter Puffer-Lösung (EBS) ersetzt. Eine Vorinkubation der Gewebe wurde mit der entsprechenden Substanz/EBS-Lösung auf der Donatorseite und EBS auf der Akzeptorseite über 30 min unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Nach

Beendigung wurden beide Kammern entleert, mind. fünfmal mit EBS gespült und wie beschrieben für die nachfolgende Permetion befüllt. Eine Equilibrierung entfiel für diese Versuche.

Tabelle 24: Entnahmezeiten für die Proben in den Permeationsstudien

	Entnahmezeiten [min]
<i>Mukosa</i>	15, 30, 45, 60, 75, 90
<i>Kornea</i>	30, 60, 120, 180, 240, 300

Um eine für die Permeationsstudien essentielle Agitation der Kompartimente zu garantieren, wurden Vorversuche bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten durchgeführt, sowie durch Farbstoffzugabe in die Kammern das Erreichen einer gleichmäßigen Verteilung optisch bewertet.

Wenn die Durchmischung der Kompartimente nicht ausreicht, hat das zur Folge, dass sich vor und hinter der Permeationsbarriere eine ruhende Schicht aufbaut, die die Permeabilität maßgeblich beeinflusst, indem die Dicke der zu durchdringenden Barriere erhöht wird. Da die Lag-time proportional ist zum Quadrat der Barrierendicke, könnte ein Vergleich der Lag-time bei unterschiedlichen Umdrehungsgeschwindigkeiten Auskunft über die Qualität der Durchmischung geben.

Tabelle 25: Ermittelte Lag-time [min] für AD-Permeationen durch Mukosa bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten [min^{-1}]

	min^{-1}		
	40	60	100
<i>Lag-time [min]</i>	$9,2 \pm 5,5$	$12,4 \pm 11,6$	$6,9 \pm 7,1$
n	5		

In Tabelle 25 sind die ermittelten Verzögerungszeiten für die Permeation von AD aus EBS durch Rindernasenmukosa bei unterschiedlichen Umdrehungen aufgeführt. Die Mukosa wurde ausgewählt, da sie die bei Agitation empfindlichste Membran darstellt und eine ausreichende aber schonende Rotationsgeschwindigkeit ermittelt werden sollte.

Die berechneten Verzögerungszeiten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, dennoch ist ein Trend zu erkennen zu längerer Lag-time bei geringerer Rotation. Darüber hinaus konnte sowohl bei 40 min^{-1} als auch bei 60 min^{-1} eine verstärkte Tendenz zur Umwandlung

des AD in TST festgestellt werden, die eventuell durch eine längere Kontaktzeit der Substanz mit der Membran und den darin enthaltenen Enzymen erklärt werden kann und in Kap. 4.3 näher untersucht wurde.

Mit Hilfe einer verdünnten Methylenblau-Lösung wurde die Durchmischung der Kammern bei 100 min^{-1} visuell überprüft. Der jeweils mit EBS gefüllten Donator- und Akzeptorkammer wurden $400 \mu\text{l}$ Puffer entnommen und durch $400 \mu\text{l}$ Farbstofflösung ergänzt. Innerhalb einer maximalen Zeit von 2 min waren die Kammern optisch homogen durchmischt.

5.2.10.1 Präparieren des Gewebes

Um die Membranen für die Permeationsstudien zu gewinnen, wurden beim nächstgelegenen Schlachthof Schweineaugen (LVAT Ruhlsdorf-Großkreutz e.V.¹, Ruhlsdorf-Teltow) und Rindernasenstücke (Eberswalder Fleischwaren, Eberswalde-Britz und Fleischwerke Lausitz, Kasel-Golzig) bezogen. Alle Gewebeproben wurden gekühlt transportiert - die Nasenstücke in EBS-Puffer-Lösung, die Augen in einem Gefäß mit feuchter Atmosphäre - und spätestens zwei Stunden nach Schlachtung der Tiere weiter verarbeitet.

Zur Gewinnung der Kornea wurde die Sklera rings um die Kornea in einem Abstand von 1 - 2 mm vorsichtig mit einem Skalpell eingeschnitten. Daraufhin wurde das Präparat mit einer Pinzette vom Augapfel abgehoben und der anhaftende Iris-Ziliar-Körper abgezogen. Nach kurzem Spülen mit Puffer-Lösung wurde die Kornea mit der Epithelseite dem Donator zugewandt in die Ussing-Kammer eingespannt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Präparat zentral und faltenfrei zwischen den Kammern lag.

Die Nasenstücke wurden unmittelbar nach Schlachtung der Rinder aus dem enthäuteten Kopf ausgeschnitten, so dass keilförmige Stücke des vorderen Teils der Nasenmuschel (*conchae nasales dorsales*) erhalten wurden. Im Labor wurde die Nasenschleimhaut mit einem Skalpell leicht eingeschnitten und darauf mit einer Klemme sehr vorsichtig vom anhaftenden Bindegewebe abgezogen, so dass rechteckige Stücke mit Seitenlängen von ca. 1 auf 2 cm erhalten wurden. Diese wurden mit der serosalen Seite auf die Akzeptorkammer gelegt und glatt gezogen, und daraufhin die Ussing-Kammer mit der Donatorhälfte verschlossen.

Bei allen Geweben wurde darauf geachtet, dass nur unversehrtes Material für die Versuche zur Anwendung kam. Die Kammern wurden nach Einspannen der Membranen zunächst auf

¹ Für die freundliche Unterstützung bei Beschaffung der Augen möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Uwarow bedanken.

der Akzeptor- und sofort danach auf der Donator-Seite mit temperiertem EBS befüllt und die Gewebe unter den beschriebenen Bedingungen ($33\text{ °C} \pm 0,5$, 100 min^{-1} , vgl. Kap. 5.2.10) equilibriert. Nach 30 min wurden beide Kammern entleert und wiederum in gleicher Reihenfolge umgehend mit frischem Puffer bzw. der Testlösung befüllt.

Die Vitalität der biologischen Membranen wurde wiederholt in der Arbeitsgruppe geprüft und kann für die Nasenschleimhaut über 10 h bei Lagerung in eisgekühlter Pufferlösung garantiert werden [74, 127] sowie für die Kornea über die Versuchsdauer von 5 h [192]. Während der Studien wurde durch Sättigung der verwendeten Pufferlösung mit Carbogen-Gas (O_2/CO_2) die Aufrechterhaltung der Vitalität unterstützt.

5.2.10.2 Synthetische Membran

Als künstliche Membran gelangte Nephrophan[®] (Filmfabrik, Wolfen) zum Einsatz. Nephrophan[®] besteht aus regenerierter Cellulose mit einem Porendurchmesser von 2,4 nm und einer Gesamtdicke von 14 – 15 μm . Das Material ist mit Sorbitol und Glycerol als Weichmacher imprägniert. Um diese zu entfernen, wurde die Membran vor dem Versuch 1 h unter fließendem Wasser gespült, darauf in ausreichender Größe ausgeschnitten und in die jeweilige Ussing-Kammer gespannt. Die Permeationsstudien wurden unter gleichen Bedingungen wie für die biologischen Gewebe durchgeführt, wobei jedoch auf eine Equilibrierung mit EBS verzichtet wurde.

5.2.11 *PENETRATIONS- UND METABOLISIERUNGS-STUDIEN*

5.2.11.1 Rindernasenschleimhaut

Die Gewebeproben wurden, wie unter Kap. 5.2.10.1 beschrieben, gewonnen und präpariert. Sofort nach dem Ablösen der Schleimhaut wurde das Präparat gründlich mit EBS-Pufferlösung abgespült, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gewogen. Vor der weiteren Verarbeitung und zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Nachdem alle Proben für eine Versuchsreihe vorbereitet waren, wurden die Gefäße mit 1,0 ml EBS-Lösung, die jeweils 25 $\mu\text{g/ml}$ Testsubstanz enthielt, aufgefüllt und sofort in einen Bioinkubator (3032, GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) platziert. Die Inkubation erfolgte über 90 min bei 33 °C und 100 min^{-1} .

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Reaktion mit 100 μl TCA (Trichloressigsäure, 34,4% in Wasser) abgebrochen und die Proben für 10 min auf Eis gesetzt. Nach Zentrifugation

(Eppendorf-Zentrifuge, 5 min, 3.500 min^{-1}) wurden vom Überstand $500 \mu\text{l}$ entnommen und mittels HPLC (vgl. Kap. 5.2.1.1) analysiert.

In der Versuchsreihe, in der die Gewebestücke extrahiert werden sollten (vgl. Kap. 4.3.2), wurde nach Ende der Inkubation das Mukosa-Stück entnommen, gründlich mit EBS-Lösung abgespült und im Exsikkator bei RT getrocknet. Zur Extraktion wurde jedes einzelne Mukosa-Stück in kleine Stücke geschnitten, in ein Zentrifugenglas überführt und mit $5,0 \text{ ml}$ eines Gemischs aus Methanol und Wasser (7:3 (V/V)) versetzt. Nach 30minütiger Quellung erfolgte mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.) eine 2minütige Homogenisierung und anschließend die Zentrifugation (3.500 min^{-1} , 5 min; Laborzentrifuge Z 230, B.Hermle AG, Gosheim). Vom klaren Überstand wurden $500 \mu\text{l}$ Probe entnommen und mittels HPLC (vgl. Kap. 5.2.1.1) analysiert.

5.2.11.2 Schweinekornea

Für die Versuche mit Schweinekornea wurde lediglich das Epithel verwendet und nach Abspülen des Augapfels mit EBS-Puffer vorsichtig mit einem Skalpell abgekratzt. Das Epithel von jeweils vier Augen wurde gepoolt, um annähernd das gleiche Gewebefeuchtgewicht zu erreichen wie bei den Mukosa-Versuchen. Im Weiteren wurde analog zu der für Rinder-mukosa beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Die EBS-Lösung wurde für die entsprechenden Versuchsreihen durch Lösungen der jeweiligen Zusatzsubstanz in arzneistoffhaltiger EBS-Lösung oder eine arzneistoffhaltige ME-Zubereitung ersetzt. Unmittelbar vor der Inkubation wurden die Proben im Eisbad für 2 min ins Ultraschallbad (RK 255 H, Bandelin electronic, Berlin) gestellt. Um die AD- und TST-Konzentrationen in der CrEL-Lösung sowie den ME-Systemen HPLC-analytisch bestimmen zu können, war es erforderlich, diese Proben vor der Detektion 1:1 mit Acetonitril zu verdünnen und die Fließmittelzusammensetzung in 54% Acetonitril und 46% Wasser (vgl. Kap. 5.2.1.1) zu ändern.

Sowohl für die Versuchsreihen mit Mukosa als auch Kornea-Epithel wurde eine gewebefreie Probe mitgeführt und die jeweilige nach Versuchsende bestimmte Konzentration als Ausgangskonzentration gewertet. Für keine der Zubereitungen wurde in den gewebefreien Proben ein Umsatz des jeweiligen Ausgangsarzneistoffs festgestellt. Weiterhin wurden für beide Gewebe arzneistofffreie Ansätze analysiert, in denen das entsprechend präparierte Gewebe in reiner EBS-Pufferlösung inkubiert wurde. Es konnte in keinem Fall über die verwendeten HPLC-Methoden ein Signal detektiert werden.

5.2.12 IN-VIVO-STUDIEN

Die Tierversuche (Kaninchen) wurden ordnungsgemäß bei der zuständigen Landesbehörde beantragt und durch diese genehmigt. Die Tierhaltung genügte den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes und beinhaltete unter anderem freien Zugang der Tiere zu Wasser und Futter sowie einen 12stündigen Tag-Nacht-Rhythmus der Beleuchtung.

Die Studien wurden mit vier männlichen New Zealand White-Kaninchen (Gewicht 3,5 – 4,5 kg; Charles River, Kißlegg, Deutschland) durchgeführt. Für die Dauer der Versuche wurden die Tiere mit einer Kombination aus Xylazin und Ketamin (0,4 mg/kg Xylazin, 40 mg/kg Ketamin, intramuskulär) sediert. Nach Applikation (fünfmal 45 µl) der Zubereitung über ein Dosiersprühsystem (Fa. Pfeiffer, Radolfzell) wurden innerhalb eines Zeitraums von 5 – 45 min in regelmäßigen Abständen jeweils sechsmal 500 µl Blut entnommen und zur Vermeidung der Blutgerinnung mit 5%iger Na-EDTA (1 mg/ml Blut) versetzt. Zur Bestimmung der physiologischen Plasmakonzentration an TST und AD wurde jeweils vor Versuchsbeginn eine Blutprobe als Leerwert entnommen, wobei in keinem Fall ein Vorliegen von AD bzw. TST detektiert wurde.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Blutproben 15 min bei 4000 min⁻¹ zentrifugiert (Z 230, B. Hermle AG, Gosheim) und das gewonnene Plasma abpipettiert. Die Plasmaproben wurden daraufhin mit 500 µl Methyl-tert. Butylether (MTBE) überschichtet und 10 min auf dem Schütteltisch (Thys 2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau) geschüttelt. Nach Abnahme des Etherüberstands wurde dieser Schritt wiederholt und beide Etherphasen wurden vereinigt. Nach Abdampfen des Ethers (RT, ca. 12 h) wurden die Proben zur späteren Aufarbeitung im Kühlschrank (2 - 8 °C) gelagert.

Zur Isolierung des Arzneistoffs aus dem Ether-Extrakt wurde eine Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) durchgeführt [157]. Die SPE-Säulen (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland) wurden vor Gebrauch nach Vorschrift zuerst mit 1000 µl Methanol und darauf mit 1000 µl Wasser konditioniert. Die eingetrockneten Proben wurden in 500 µl EBS aufgenommen und nach 2 min Ultraschallbehandlung (RK 255 H, Bandelin electronic, Berlin) auf die vorbereiteten Säulen gezogen. Die Vorratsgefäße wurden mit weiteren 500 µl EBS ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls auf die entsprechenden Säulen gegeben. Die beladenen Säulen wurden zweimal mit jeweils 200 µl Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanol-Eluat wurden abgedampft und zur nachfolgenden HPLC-Analyse (s. Kap. 5.2.1.1) in 100 µl Acetonitril, das 1,0 µg/ml AD als internen Standard enthielt, aufgenommen.

Tabelle 26: Wiederfindungsraten für AD [%] mittels der unterschiedlichen Methoden in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration

Ausgangs- konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Wiederfindungsraten [%]		
	Schweineplasma	SPE aus Pufferlösung	SPE aus Schweineplasma
25,0	85,1 \pm 9,0		
1,0	118,1 \pm 14,8		
0,5	90,4 \pm 10,7	111,0 \pm 2,5	74,0 \pm 8,0
0,2		102,2 \pm 12,1	
0,1		61,0 \pm 14,9	

n = 5 – 18

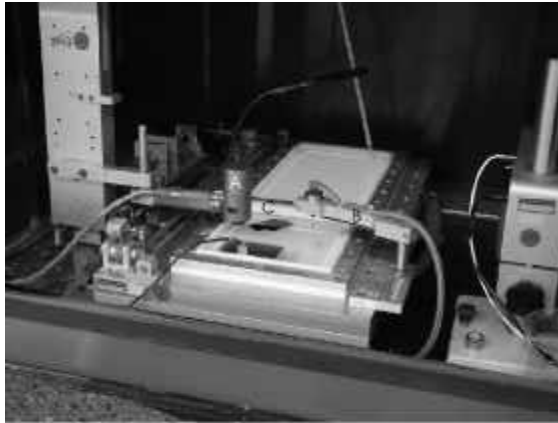
Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten für AD wurden Extraktionen aus Schweineplasma (LVAT Ruhlsdorf-Großkreutz e.V., Ruhlsdorf-Teltow) in analoger Vorgehensweise sowie ohne nachfolgende SPE durchgeführt. Darüber hinaus wurden Wiederfindungsraten für die SPE als Einzelschritt bestimmt, indem AD/EBS-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen extrahiert wurden. Tabelle 26 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Für die SPE lagen die Wiederfindungsraten für den Arzneistoff jeweils um 100%, abgesehen von der niedrigsten Ausgangskonzentration mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ AD. Die Wiederfindungsrate nach Ether-Extraktion und anschließender SPE ergab niedrigere Werte als ohne nachfolgende SPE aufgrund der Verlustraten in den zusätzlichen Arbeitsschritten.

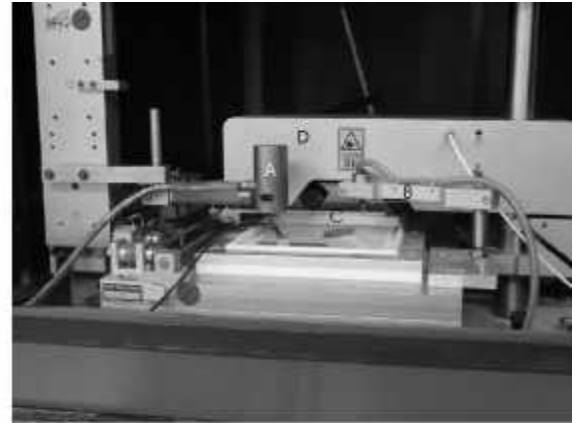
5.2.13 BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN

Üblicherweise werden am Langmuir-Trog Filme an einer Flüssigkeit/Luft-Grenzfläche charakterisiert, indem eine Barriere kontinuierlich die Trog-Oberfläche verkleinert und dabei Oberflächendruck und Oberflächenpotential aufgezeichnet werden. Dabei wird der Film von einer in der Flüssigkeit (Subphase) unlöslichen Substanz bzw. einem Substanzgemisch gebildet, die sich in bestimmter Weise an der Oberfläche anordnet. Meist besteht die Subphase aus

Wasser oder einer wässrigen Lösung. In Abb. 35 ist der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau abgebildet.



a)



b)

Abb. 35: Abbildung des Versuchsaufbaus¹: Langmuir-Trog mit Schwingkondensator (A), Wilhelmy-Waage (B) und beweglicher Barriere (C) a) ohne BAM, b) mit BAM (D)

Der *Oberflächendruck* oder Schub (π) stellt die Differenz aus der Oberflächenspannung der unbedeckten Wasseroberfläche σ_0 und der Oberflächenspannung der mit einem Film bedeckten Wasseroberfläche σ dar.

$$p = s_0 - s$$

Die Messung erfolgt mittels einer Wilhelmy-Waage (Abb. 35, B). Dabei wird die Kraft bestimmt, die an einem Filterpapierstreifen wirkt, der ein Stück weit senkrecht in die Wasseroberfläche eintaucht. Wenn der Oberflächendruck hoch ist, bewegt sich das Filterpapier nach oben, bei niedrigem Druck nach unten.

Das *Oberflächenpotential* wird mit der Schwingkondensatormethode (Abb. 35, A) bestimmt. Dabei befindet sich eine Platinplatte in der Subphase, die mit einer schwingenden Gegenplatte verbunden ist, welche ca. 2 mm über der Wasseroberfläche angebracht ist. Durch die Schwingungen ändert sich die Kapazität des Kondensators periodisch und induziert einen Wechselstrom. Die Gegenspannung, die erforderlich ist, um den Strom zu kompensieren, entspricht dem Voltapotentiale des Kondensators. Gemessen wird das Oberflächenpotential als Differenz aus der Potentialdifferenz zwischen der Platinelektrode und der filmbedeckten

¹ Für die Überlassung der Fotografien möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Möbius herzlich bedanken.

Wasseroberfläche und der Potentialdifferenz zwischen der Platinelektrode und der freien Wasseroberfläche.

Weiterhin ist es bei dieser Messanordnung möglich, die Struktur der Oberfläche über ein Brewsterwinkel-Mikroskop (BAM) zu betrachten [175]. Trifft p-polarisiertes Licht unter dem Brewsterwinkel auf eine ideale Grenzfläche zweier nicht-absorbierender Medien, so wird kein Licht reflektiert. Aus den Fresnel'schen Betrachtungen ergibt sich für den Brewsterwinkel folgende Beziehung:

$$\tan \alpha = \frac{n_2}{n_1}$$

Dabei beschreiben n_1 und n_2 die Brechungsindices der beiden Medien an der Grenzfläche. Für die beiden Medien Luft und Wasser mit den jeweiligen Brechungsindices $n_1 = 1$ für Luft und $n_2 = 1,333$ für Wasser, bezogen auf Laserdioden-Licht mit einer Wellenlänge von 660 nm, beträgt der Brewsterwinkel 53,1°. Befindet sich ein gespreiteter Film auf der Wasseroberfläche, sind die Bedingungen für den Brewsterwinkel nicht länger erfüllt, so dass Licht reflektiert wird und über ein Mikroskop mittels einer Kamera im Brewsterwinkel beobachtet werden kann. Die Intensität des reflektierten Lichts ist abhängig von der Dichte der Moleküle auf der Oberfläche und von deren Anordnung bzw. Struktur.

Für die hier durchgeführten Messungen (Tabelle 27) wurde ein Teflon-Trog mit einer Spreitfläche von 353 cm² (Länge = 32 cm, Breite = 11 cm, Tiefe = 0,8 cm) verwendet, die durch eine bewegliche Barriere (Abb. 35, C) mit einer Geschwindigkeit von 16,2 cm²/min auf maximal 115 cm² verkleinert werden konnte, da an dieser Stelle das BAM installiert war (Abb. 35, D). Mittels BAM wurde ein fixer Flächenausschnitt der Trogoberfläche beobachtet, durch den der Film von der Barriere bewegt wurde.

Tabelle 27: Übersicht über die durchgeführten Messungen am Langmuir-Trog

gespreitete Substanzen (jeweils aus Chloroform)	Subphase (jeweils wässrige Lösungen)
60 µg MGS 20 µg CrEL 80 µg IPM	<ul style="list-style-type: none"> • Wasser
10 µg MGS	<ul style="list-style-type: none"> • Wasser • HP-γ-CD (1%) • HTAP-β-CD (1%) • CrEL (0,1%) • ME-CD (0,1% und 1%) • ME-PG (0,1%) • ME-ION (0,1%) • PG (1%) • HP-γ-CD (9%) + CrEL (20%) davon 1% in Wasser • HTAP-β-CD (9%) + CrEL (20%) davon 1% in Wasser • liposic® (0,1%)

Als Subphase dienten wässrige Lösungen der zu testenden Zubereitungen (Tabelle 27) oder destilliertes Wasser (Milli-Q-System, Millipore). Die zu spreitende Substanz wurde in Chloroform (J.T. Baker, Deventer, Holland) gelöst und mit einer Mikroliterspritze langsam auf die Subphase gegeben. Das Chloroform verdampfte innerhalb kurzer Zeit, und die wasserunlöslichen bzw. amphiphilen Moleküle verblieben an der Oberfläche. Alle Versuche wurden gerätetechnisch begründet bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.2.14 STATISTIK

Die Signifikanzermittlung erfolgte mittels ANOVA. Zuvor wurden die beiden vorausgesetzten Kriterien, Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen, getestet. Als Post-Test zur Ermittlung der Signifikanzen wurde der Student-Newman-Keul's Test durchgeführt. In einzelnen, gekennzeichneten Fällen kam der Student's t-Test zur Anwendung. Alle Tests wurden mit der Statistiksoftware SigmaStat 2.0 durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet für $p < 0,05$.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die anatomisch und physiologisch unterschiedlichen, aber im funktionellen Zusammenhang stehenden Membranen der beiden Sinnesorgane Auge (Kornea) und Nase (Mukosa) wurden hinsichtlich ihrer transzellulären In-vitro-Permeabilität vergleichend untersucht. Ein bereits etabliertes, modifiziertes Ussing-Kammer-Modell wurde hierzu in der Art weiter modifiziert, dass beide Membranen eingespannt werden konnten. Als Modell-Arzneistoff diente das lipophile Androstendion (AD) und partiell auch das Testosteron (TST). Beide Steroidhormone wurden weiterhin zu Penetrations- und Metabolisierungsstudien an Schweinekornea bzw. Rindernasemukosa herangezogen. Zur Charakterisierung der parazellulären Permeabilität der Kornea gelangte der hydrophile Teststoff Fluorescein-Na (FSC) zum Einsatz. Um darüber hinaus membran-unabhängige Effekte, die durch Rezepturkomponenten der im Donator befindlichen Testlösungen verursacht werden, zu differenzieren, wurden für AD und FSC analoge Permeationsversuche an der synthetischen Zellulosemembran Nephrophan[®] durchgeführt.

Während im Fall von Nephrophan[®] sowohl für AD als auch für FSC aus Pufferlösung (EBS) nahezu gleiche Permeabilitätskoeffizienten (P_{eff}) resultierten ($\sim 3 \cdot 10^{-5}$ cm/s), und auch die Permeabilität von Nasenmukosa für AD mit einem Wert von $\sim 2 \cdot 10^{-5}$ cm/s in der gleichen Größenordnung lag, ergaben sich für die Kornea deutlich niedrigere Werte ($0,73 \cdot 10^{-5}$ cm/s für AD und $0,99 \cdot 10^{-6}$ cm/s für FSC). Diese korneaspezifischen Unterschiede konnten auf die differenzierten Membranstrukturen (dreischichtiges, lipophil-hydrophiles Gewebe mit einer Dicke von ca. 400 μm) zurückgeführt werden und im Zusammenhang mit den Oktanol/Puffer-Verteilungskoeffizienten (AD = 593, FSC = 0,2) sowie der Verteilung der beiden Substanzen zwischen Donatorlösung und Gewebe interpretiert werden.

Zur optimierten okularen und nasalen Applikation von AD in therapeutischen Konzentrationen wurden Mikroemulsionen (ME) als potentielle Arzneiträgersysteme auf Basis von Isopropylmyristat (IPM), Wasser und Cremophor[®] EL (CrEL) als Tensid entwickelt. Als Koterside gelangten Propylenglykol (PG ME-PG), Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HP- γ -CD ME-CD) sowie das kationische Hydroxytrimethylammoniopropyl- β -Cyclodextrin (HTAP- β -CD ME-ION) zur Anwendung. Der Einfluss dieser Rezepturkomponenten sowie der ME auf das Permeationsverhalten von AD und FSC wurde untersucht und die P_{eff} bzw. Permeationsraten wurden bestimmt.

Die mukosale Permeation von AD zeigte, mit Ausnahme von CrEL, keine signifikante Beeinflussung durch die unterschiedlichen Trägermedien. Die durch CrEL bedingte Absenkung

des P_{eff} ist dem mizellaren Einschluss des Arzneistoffs sowie einer Membranbelegung durch das Tensid zuzuschreiben. Im Gegensatz dazu resultierten für die Kornea sowohl durch die Einzelkomponenten als auch durch die ME bedingte signifikante Reduzierungen der AD-Permeabilitätskoeffizienten. Abweichend war das Versuchsergebnis allerdings bei Addition geringer Mengen von HP- γ -CD, die einen permeationsfördernden Effekt ausübten. Dieses Phänomen lässt sich mit einer Art Carrier-Funktion des CD durch hydrophile Bereiche, die der Epitheloberfläche anhaften, erklären.

Die hydrophile Testsubstanz FSC ergab in Anwesenheit der Hilfsstoffe bzw. ME (Ausnahme ME-ION) an beiden getesteten Barrieren (Kornea und Nephrophan[®]) gegenüber der Referenz (EBS) signifikant reduzierte P_{eff} . Da sowohl die Nephrophan[®]- als auch die Kornea-permeabilität des FSC durch die CD und CrEL reduziert war, sind Inklusion bzw. elektrochemische sowie mizellare Wechselwirkungen des FSC mit diesen Komponenten anzunehmen. Interessanterweise setzten HP- γ -CD und CrEL, besonders aber HTAP- β -CD, die Lag-time in den Kornea-Permeationen herab, was für eine temporäre Beeinflussung der Poren oder Tight-junctions spricht. Ein dauerhaft membranschädigender Effekt dieser Substanzen kann jedoch ausgeschlossen werden, da nach Vorinkubierung bestenfalls eine tendenzielle Veränderung von P_{eff} und Lag-time gegenüber dem EBS-Wert gefunden wurde.

Zur okularen Anwendung könnte ME-ION ein geeignetes System darstellen, wenn vorzugsweise lokale Effekte erzielt werden sollen, wie im Fall des lipophilen AD zur Therapie der Keratoconjunctivitis sicca, was keinen Membrandurchtritt erfordert. Andererseits scheint dieses Trägersystem auch Eignung für zu absorbierende hydrophile Wirkstoffe aufzuweisen, wie aus den Versuchen mit FSC abzuleiten ist. Die anderen beiden ME können im Spezialfall ebenfalls potente Trägersysteme repräsentieren - ihre physiologische Verträglichkeit vorausgesetzt -, wobei sich für Nasalia unter Anwendung von CD für lipophile Wirkstoffe gute Lösungseigenschaften mit verzögerter Freisetzung vereinigen ließen.

Als vorteilhaft sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der getesteten ME zu bewerten. Ihre relativ niedrige Viskosität gewährleistet die Tropf- und Sprühbarkeit. Tonizität und pH-Wert lassen auf allenfalls geringe Reizerscheinungen schließen (Ausnahme: Tonizität von ME-PG, vgl. 4.1.3.2), und die physiologischen Funktionen der Sinnesorgane Auge und Nase dürften durch die Verdünnbarkeit der Systeme mit Wasser sowie ihre Transparenz wenig beeinflusst werden. Hinsichtlich der Schleimhautkompatibilität liegt zumindest für eine Modifizierung des Systems ME-PG mit 5% PG statt der hier verwendeten 9% die im HET-CAM-Test erwiesene Klassifizierung „praktisch nicht irritierend“ vor [73].

Die mit AD und TST sowohl an homogenisiertem Schweinekornea-Epithel als auch an intakter Rindernasenmukosa durchgeführten Penetrations- und Metabolisierungsstudien erbrachten gewebespezifische Ergebnisse. Aus den Mukosa-Versuchen resultierten eine vollständige Wiederfindung des eingesetzten Arzneistoffs im Inkubationsmedium sowie ein enzymatischer Umsatz in gleicher Größenordnung (ca. 4%) für beide Substanzen. Aufgrund der hohen Durchlässigkeit der Mukosa für die lipophilen Arzneistoffe erfolgte offensichtlich ein schneller Konzentrationsausgleich zwischen Lösung und Membran.

Im Kornea-Epithelzellhomogenat wurde dagegen eine drastische Reduzierung der Wiederfindungsrate auf ca. 30% sowie eine deutlich höhere Metabolisierungsrate von TST zu AD erfasst, was mit der Zerstörung der Gewebestrukturen und damit einhergehender Adsorption von Arzneistoff an Zellbestandteile einerseits und mit Erhöhung der reaktiven Enzymkonzentration andererseits diskutiert wird.

Am kornealen Epithel wurde weiterhin der Einfluss der ME und ihrer Bestandteile auf die Penetrations- und enzymatischen Umsatzraten geprüft. Im Ergebnis wurde generell eine verminderte Adsorption an Gewebekomponenten festgestellt, d.h. die Wiederfindungsraten im Zentrifugat lagen zwischen 60 und 100%. Das Kotensid PG zeigte auf die Verteilung des jeweiligen Substrats keinen Einfluss. Diese Resultate korrelieren mit den Permeationsdaten, indem sich verminderte P_{eff} -Werte bereits auf eine reduzierte Penetration und Verteilung im Kornea-Epithel zurückführen lassen. Verantwortlich hierfür sind primär die bereits in der Formulierung vorliegenden Arzneistoff-Hilfsstoff-Assoziate.

In gleicher Weise kann der ermittelte Rückgang der jeweiligen Metabolisierungsrate durch Interaktionen der Rezepturkomponenten mit AD bzw. TST erklärt werden. Insbesondere war der Umsatz von TST zu AD durch Inklusion in die beiden CD bzw. durch Mizelleinschluss mittels CrEL, wodurch der Enzym/ Substrat-Kontakt vermutlich erschwert wird, effektiv reduziert.

Im Hinblick auf eine mögliche okulare und/oder nasale Anwendung des AD wurden der jeweiligen Intention entsprechende weiterführende Untersuchungen angestellt. Bei okularem Einsatz des AD bei der Indikation „Trockenes Auge“ wird eine lokale Wirkung auf die Tränen- oder Meibom'schen Drüsen präferiert. Insofern ist einem möglichen Einfluss der Trägerformulierung auf den Tränenfilm eine wesentliche Bedeutung beizumessen. Daher wurde versucht, im Langmuir-Trog durch biophysikalische Charakterisierung eines Oberflächenfilms aus dem Sekret der Meibom'schen Drüse (MGS), das auf eine Subphase entsprechender wässriger Lösungen der ME bzw. ihrer Bestandteile aufgespreitet wurde, Wechselwirkungen

deutlich zu machen und Veränderungen des Films mittels Brewsterwinkel-Mikroskop (BAM) zu erfassen.

Durch Zugabe der Kotenside HP- γ -CD bzw. HTAP- β -CD zur Subphase war im Gegensatz zu PG nur ein sehr geringer Effekt auf das gespreitete MGS zu konstatieren. Während einer Komprimierung von MGS auf wässrigen Lösungen der drei ME-Systeme waren hingegen keine differenzierten Effekte zu detektieren, und das Oberflächenverhalten wurde hauptsächlich auf den Einfluss des Tensids CrEL zurückgeführt.

Im Gegensatz zum Fertigarzneimittel liposic[®], das zur Anwendung am Trockenen Auge zugelassen ist, ergab sich für CrEL und die ME ein zeitlich verzögerter Abbau- bzw. Lösungsvorgang der MGS-Oberflächenstrukturen, was bei einer Anwendung am Auge für den Erhalt der physiologischen Tränenfilmstruktur vorteilhaft sein könnte. Darüber hinaus können Wechselwirkungen zwischen den beiden CD bzw. CrEL, wie sie in den ME anzunehmen sind, zu einer Abmilderung physiologisch eventuell nachteiliger Effekte der Einzelkomponenten, wie sie allgemein für einige Tenside bzw. CD bekannt sind, führen und einen Lösungsvorgang des kornealen Lipidfilms weiter retardieren.

Um den nasalen Applikationsweg näher zu charakterisieren, wurden In-vivo-Versuche an Kaninchen durchgeführt, da die Permeationsstudien für eine systemische Resorption lediglich orientierenden Charakter haben können. Unter In-vivo-Bedingungen kommen Einflussfaktoren, wie die nasale Clearance, Substanzverlust durch enzymatischen Abbau und Abfließen über den Nasen-Rachenraum, Effekte der Zubereitung auf die lokale Durchblutung sowie eventuelle Reizerscheinungen zum Tragen. In dieser Arbeit konnten jedoch keine konkreten Aussagen zur Resorption von AD nach nasaler Gabe getroffen werden, da sich die Applikation einer ausreichend hohen Arzneistoff-Konzentration sowie die Aufarbeitung der gewonnenen Plasmaproben als problematisch herausstellten. Aufgrund des beobachteten Verhaltens der Tiere waren keine makroskopischen Beeinträchtigungen durch die ME feststellbar, was vorsichtig auf eine physiologische Verträglichkeit der Systeme schließen lässt.

Im Hinblick auf die Untersuchungen an den ME-Systemen ergaben sich vielversprechende Vorteile für einen nasalen und/oder okularen Einsatz sowohl als Arzneistoffträgersysteme als auch als wirkstofffreie Formulierungen, wobei weitere Untersuchungen, vor allem hinsichtlich der physiologischen Verträglichkeit, sowie umfangreiche In-vivo-Studien für eine endgültige Beurteilung herangezogen werden müssen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1:	ANATOMIE DES MENSCHLICHEN AUGES; NACH [26]	12
ABB. 2:	SCHEMATISCHER QUERSCHNITT DURCH DIE KORNEA; NACH [15]	13
ABB. 3:	SCHEMATISierter AUFBAU DES TRÄNENFILMS; NACH [21]	15
ABB. 4:	ANATOMIE DER MENSCHLICHEN NASE: A = NASENVORHOF, B = ATRIUM, ...	17
ABB. 5:	QUERSCHNITT DURCH DIE NASENSCHLEIMHAUT; NACH [32]	18
ABB. 6:	4-ANDROSTEN-3,17-DION (ANDROSTENDION, AD)	24
ABB. 7:	17 β -HYDROXY-4-ANDROSTEN-3-ON (TESTOSTERON, TST)	25
ABB. 8:	2-(6-HYDROXY-3-OXO-3H-XANTHEN-9-YL)BENZoesÄURE, DINATRIUMSALZ ...	26
ABB. 9:	SAXS-DIFFRAKTOGRAMME DER ZUBEREITUNGEN ME-CD, ME-ION SOWIE ...	42
ABB. 10:	SÄTTIGUNGSLÖSLICHKEITEN (C_s) VON AD IN VERSCHIEDENEN FORMULIERUNGEN ...	46
ABB. 11:	DSC-THERMOGRAMM: (A) AD, (B) HTAP- β -CD, (C) AD/HTAP- β -CD-LYOPHILISAT, ...	47
ABB. 12:	LÖSLICHKEITSISOTHERMEN VON AD IN GEGENWART VON HP- γ -CD BZW. ...	49
ABB. 13:	P_{EFF} VON AD (25 μ G/ML) DURCH MUKOSA FÜR UNTERSCHIEDLICH HERGESTELLTE ...	61
ABB. 14:	PLASMA-ZEIT-PROFILE NACH NASALER APPLIKATION UNTERSCHIEDLICHER AD-...	83
ABB. 15:	SCHEMATISCHER QUERSCHNITT DURCH EINE MEIBOM'SCHE DRÜSE IM ...	86
ABB. 16:	SKIZZE EINES LANGMUIR-TROGS: AMPHIPHILE MOLEKÜLE VOR (LINKS) UND ...	87
ABB. 17:	MGS (10 μ G) AUF WASSER BEI 76% KOMPRIMIERUNG ($A=173 \text{ cm}^2$)	89
ABB. 18:	MGS (60 μ G) AUF EBS BEI 98% KOMPRIMIERUNG ($A=119 \text{ cm}^2$)	90
ABB. 19:	MGS (10 μ G) AUF CREL (0,1 % IN WASSER) BEI 29% KOMPRIMIERUNG ($A=284 \text{ cm}^2$)	90
ABB. 20:	SCHUB (BLAU) UND POTENTIAL (ORANGE) VON MGS (10 μ G) AUF CREL ...	91
ABB. 21:	MGS (10 μ G) AUF HP- γ -CD (1% IN WASSER) BEI 29% KOMPRIMIERUNG ($A=284 \text{ cm}^2$)	93
ABB. 22:	MGS (10 μ G) AUF HP- γ -CD (1% IN WASSER) BEI 80% EXPANSION NACH ...	94
ABB. 23:	MGS (10 μ G) AUF HTAP- β -CD (1% IN WASSER) BEI 50% KOMPRIMIERUNG ...	95
ABB. 24:	MGS (10 μ G) AUF PG (1,0% IN WASSER) BEI 95% KOMPRIMIERUNG ($A=127 \text{ cm}^2$)	96
ABB. 25:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1% IN WASSER) BEI 18% KOMPRIMIERUNG ($A=310 \text{ cm}^2$)	97
ABB. 26:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1% IN WASSER) BEI 69% KOMPRIMIERUNG ($A=189 \text{ cm}^2$)	98
ABB. 27:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1% IN WASSER) BEI 75% KOMPRIMIERUNG ($A=173,7 \text{ cm}^2$)	98
ABB. 28:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1% IN WASSER) BEI 15% EXPANSION ($A=149,7 \text{ cm}^2$)	98
ABB. 29:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1% IN WASSER) BEI 71% EXPANSION ($A=284 \text{ cm}^2$)	99
ABB. 30:	SCHUB (BLAU) UND POTENTIAL (ORANGE) VON MGS (10 μ G) AUF ME-CD (0,1%)	99
ABB. 31:	MGS (10 μ G) AUF ME-CD (1,0% IN WASSER) BEI 66% EXPANSION ($A=272 \text{ cm}^2$)	101
ABB. 32:	MGS (10 μ G) AUF ME-ION (1,0% IN WASSER) BEI 33% KOMPRIMIERUNG ($A=275 \text{ cm}^2$)	103
ABB. 33:	MGS (10 μ L) AUF LIPOSIC® (0,1% IN WASSER) BEI 75% KOMPRIMIERUNG ($A=174 \text{ cm}^2$)	105
ABB. 34:	SKIZZE DER PERMEATIONSZELLEN: QUERSCHNITT DURCH DEN MITTELPUNKT, ...	116
ABB. 35:	ABBILDUNG DES VERSUCHSAUFBAUS: LANGMUIR-TROG MIT SCHWING...	123

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: PHYSIKALISCH-CHEMISCHE PARAMETER DER TRÄNEN	15
TABELLE 2: GEGENÜBERSTELLUNG DER ABSORPTIONSVORAUSSETZUNGEN VON AUGEN UND NASE	20
TABELLE 3: EINFLUSS VON FORMULIERUNGSPARAMETERN AUF DIE ABSORPTION ...	22
TABELLE 4: PROZENTUALE ZUSAMMENSETZUNG [G/G] DER MIKROEMULSIONEN	32
TABELLE 5: PHYSIKALISCH-CHEMISCHE PARAMETER DER MIKROEMULSIONEN	37
TABELLE 6: OBERFLÄCHENSPIGUNG VERSCHIEDENER CREMOPHOR® EL-MISCHUNGEN	38
TABELLE 7: MISCUNGSENTHALPIEN VON ME-CD MIT UNTERSCHIEDLICHEM KOTENSID-...	40
TABELLE 8: VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN (VK) VON ANDROSTENDION (AD) UND ...	44
TABELLE 9: REL. MOLMASSE (M_{REL}), GERADENANSTIEG ($TAN \alpha$) BEI MOLARER AUFTRAGUNG ...	49
TABELLE 10: P_{EFF} UND LAG-TIME FÜR AD (25 μ G/ML) AUS EBS UND FORMULIERUNGEN MIT HP- γ -CD	55
TABELLE 11: P_{EFF} UND LAG-TIME FÜR AD (25 μ G/ML) AUS EBS UND MIT CREL-ZUSATZ	58
TABELLE 12: P_{EFF} UND LAG-TIME FÜR AD (25 μ G/ML) AUS EBS, ME-PG UND ME-CD	60
TABELLE 13: P_{EFF} UND LAG-TIME VON AD (25 μ G/ML) DURCH NEPHROPHAN® UNTER EINFLUSS ...	62
TABELLE 14: P_{EFF} UND LAG-TIME FÜR AD (25 μ G/ML) AUS ME-ION UND MIT HTAP- β -CD	63
TABELLE 15: KUMULIERTE AD-MENGEN (Q) [μ G/ML] ^A NACH DER JEWEILIGEN ...	65
TABELLE 16: P_{EFF} UND LAG-TIME VON AD UND TST (BEIDE 25 μ G/ML) JEWEILS AUS EBS	67
TABELLE 17: P_{EFF} UND LAG-TIME VON FSC (25 μ G/ML) DURCH KORNEA UND NEPHROPHAN®	69
TABELLE 18: PENETRATION UND METABOLISIERUNG VON AD AUS EBS IN MUKOSA	75
TABELLE 19: PENETRATION UND METABOLISIERUNG VON TST AUS EBS IN MUKOSA	75
TABELLE 20: PENETRATION UND METABOLISIERUNG VON AD IM KORNEA-EPITHEL	77
TABELLE 21: PENETRATION UND METABOLISIERUNG VON TST IM KORNEA-EPITHEL	78
TABELLE 22: PHYSIKALISCH-CHEMISCHE PARAMETER DES MGS (VGL. AUCH TABELLE 1)	86
TABELLE 23: PARAMETER DER HPLC-ANALYTIK FÜR AD UND TST	110
TABELLE 24: ENTNAHMEZEITEN FÜR DIE PROBEN IN DEN PERMEATIONSTUDIE	117
TABELLE 25: ERMITTELTE LAG-TIME [MIN] FÜR AD-PERMEATIONEN DURCH MUKOSA BEI ...	117
TABELLE 26: WIEDERFINDUNGSRATEN FÜR AD [%] MITTELS DER UNTERSCHIEDLICHEN ...	122
TABELLE 27: ÜBERSICHT ÜBER DIE DURCHFÜHRTE MESSUNGEN AM LANGMUIR-TROG	125

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Europäisches Arzneibuch 2002, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag, Pharm. Verlag GmbH, Eschborn
- [2] Lee, Y.-C., Simamora, P., Yalkowsky, S.H., Effect of Brij-78 on systemic delivery of insulin from an ocular device, *J. Pharm. Sci.* (1997) 86; 430-433
- [3] Dondeti, P., Zia, H., Needham, T.E., In vivo evaluation of spray formulations of human insulin for nasal delivery, *Int. J. Pharm.* (1995) 122; 91-105
- [4] Hussain, A.A., Al-Bayatti, A.A., Dakkuri, A., Okochi, K., Hussain, M.A., Testosterone 17 β -N,N-Dimethylglycinate Hydrochloride: a prodrug with a potential for nasal delivery of testosterone, *J. Pharm. Sci.* (2002) 91; 785-789
- [5] Illum, L., Watts, P., Fisher, A.N., Hinchcliffe, M., Norbury, H., Jabbal-Gill, I., Nankervis, R., Davis, S.S., Intranasal delivery of morphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002) 301; 391-400
- [6] Verhoef, J.C., Merkus, F.W.H.M., Nasal absorption enhancement: Relevance to nasal drug delivery, in: deBoer, A. G. (Hrsg.), *Drug Absorption Enhancement*, Harwood Academic Publisher, Chur, 1994, pp. 119-153
- [7] Thadikonda, K.P., Lau-Cam, C.A., Thadikonda, V.L., Theofanopoulos, V., Nasal delivery of atenolol and timolol in the rat and the effect of absorption enhancers, *Drug Devel. Ind. Pharm.* (1995) 21; 349-360
- [8] Furrer, P., Mayer, J.M., Plazonnet, B., Gurny, R., Ocular tolerance of absorption enhancers in ophthalmic preparations, *AAPS Pharm. Sci.* (2002) 4; 1-5
- [9] Sullivan, D.A., Wickham, L.A., Rocha, E.M., Krenzer, K.L., Sullivan, B.D., Steagull, R., Cermak, J.M., Dana, M.R., Ullman, M.D., Sato, E.H., Gao, J., Rocha, F.J., Ono, M., Silveira, L.A., Lambert, R.W., Kelleher, R.S., Tolls, D.B., Toda, I., Androgens and dry eye in Sjogrens's syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1999) 22; 312-324
- [10] Sullivan, D.A., Sullivan, B.D., Evans, J.E., Schirra, F., Yamagami, H., Liu, M., Richards, S.M., Suzuki, T., Schaumberg, D.A., Sullivan, R.M., Dana, M.R., Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction and evaporative dry eye, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2002) 966; 211-222

-
- [11] Haecker, R., Kämpfe, E., Mattern, C., Androgenic substitution for the ageing male by nasal administration of a precursor of testosterone, Symp. Healthy ageing of male, Genf, 1998
- [12] Siefert, B., Einfluss von Cyclodextrin auf die Löslichkeit und okulare Verfügbarkeit von Pilocarpin-HCl bzw. Thalidomid, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1998
- [13] Hockwin, O., Biochemie des Auges, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1985
- [14] Sarkar, M.A., Drug metabolism in the nasal mucosa, Pharm. Res. (1992) 9; 1-9
- [15] Mitra, A.K. (Ed.), Ophthalmic Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York 1993
- [16] Loftssona, T., Järvinen, T., Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery, Adv. Drug Del. Rev. (1999) 36; 59-79
- [17] Doane, M.G., Jensen, A.D., Dohlman, C.H., Penetration routes of topically applied eye medications, Am. J. Ophthalmol. (1978) 85; 383-386
- [18] Ahmed, I., Gokhale, R.D., Shah, M.V., Patton, T.F., Physicochemical determinants of drug diffusion across the conjunctiva, sclera and cornea, J. Pharm. Sci. (1987) 76; 583-586
- [19] Hämäläinen, K.M., Kananen, K., Auriola, S., Kontturi, K., Urtti, A., Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva and sclera, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38; 627-634
- [20] Huang, A.J.W., Tseng, S.C.G., Kenyon, K.R., Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1989) 30; 684-689
- [21] Dilly, P.N., Guillon, M., McGrogan, L., Video Biomicroscopy of the tear film, Adv. Exp. Med. Biol. (1998) 438; 737-743
- [22] Sharma, A., Breakup and dewetting of the corneal mucus layer, Adv. Exp. Med. Biol. (1998) 438; 273-280
- [23] Tiffany, J.M., The Lipid Secretion of the Meibomian Glands, Adv. Lipid. Res. (1987) 22; 1-62
- [24] Mishima, S., Nagataki, S., Conrad Berens memorial lecture: Pharmacology of ophthalmic solutions, Contact Lens (1978) 4; 22-46

-
- [25] Mishima, S., Gasset, A., Klyce, S.D.Jr., Baum, J.L., Determination of tear volume and tear flow, *Invest. Ophthalmol.* (1966) 5; 264-276
- [26] Bauer, K.H., Frömming, K.-H., Führer, C., *Pharmazeutische Technologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1993
- [27] Reddy, I.K., (Ed.), *Ocular Therapeutics and Drug Delivery*, Technomic Pub. Comp. Inc., Lancaster/Basel, 1996, pp. 34-49
- [28] Ibrahim, H., Buri, P., Gurny, R., Composition, structure et paramètres physiologiques du système lacrymal impliqués dans la conception des formes ophtalmiques, *Pharm. Acta. Helv.* (1988) 63; 146-154
- [29] Nagyova, B., Tiffany, J.M., Components responsible for the surface tension of human tears, *Current Eye. Res.* (1999) 19; 4-11
- [30] Kumar, G.N., Drug metabolizing enzyme systems in the eye, in: Reddy, I.K., (Ed.), *Ocular Therapeutics and Drug Delivery*, Technomic Pub. Comp. Inc., Lancaster/Basel, 1996, pp. 149-167
- [31] Illum, L., Nasal Delivery. The use of animal models to predict performance in man, *J. Drug Target.* (1996) 3; 427-442
- [32] Cornaz, A.-L., Buri, P., Nasal mucosa as an absorption barrier, *Eur. J. Phar. Biopharm.* (1994) 40; 261-270
- [33] Gizurarson, S., Animal models for intranasal drug delivery studies, *Acta Pharm. Nord.* (1990) 2; 105-122
- [34] Narawane, L., Lee, V.H.L., Absorption barriers, in: deBoer, A.G. (Ed.), *Drug Absorption Enhancement*, Harwood Academic Publisher, Chur, 1994, pp. 3-5
- [35] Behl, C.R., Pimplaskar, H.K., Sileno, A.P., deMeireles, J., Romeo, V.D., Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* (1998) 29; 89-116
- [36] Sakane, T., Akizuki, M., Yoshida, M., Yamashita, S., Nadai, T., Hashida, M., Sezaki, H., Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity, *J. Pharm. Pharmacol.* (1991) 43; 449-451

-
- [37] Sakane, T., Akizuki, M., Taki, Y., Yamashita, S., Sezaki, H., Nadai, T., Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs, *J. Pharm. Pharmacol.* (1995) 47; 379-381
- [38] Muchtar, S., Abdulrazik, M., Frucht-Pery, J., Benita, S., Ex-vivo study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea, *J. Control. Rel.* (1997) 44; 55-64
- [39] Waga, J., Ehinger, B., Passage of drugs through different intraocular microdialysis membranes, *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* (1995) 233; 31-37
- [40] Keipert, S., Ophthalmika, etablierte Arzneiformen und neue Konzepte, in: Müller, R.H., Hildebrand, G.E., (Hrsg.), *Pharmazeutische Technologie - Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998; pp. 77-98
- [41] Williams, A.C., Barry, B.W., Skin absorption enhancers, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* (1992) 9; 305-353
- [42] Agarwal, V., Mishra, B., Recent trends in drug delivery systems: intranasal drug delivery, *Ind. J. Exp. Biol.* (1999) 37; 6-16
- [43] Maitani, Y., Ishigaki, K., Takayama, K., Nagai, T., In vitro nasal transport across rabbit mucosa: effect of oxygen bubbling, pH and hypertonic pressure on permeability of lucifer yellow, diazepam and 17 β -estradiol, *Int. J. Pharm.* (1997) 146; 11-19
- [44] Grass, G.M., Robinson, J.R., Mechanism of corneal drug penetration I: In vivo and in vitro kinetics, *J. Pharm. Sci.* (1988) 77; 3-14
- [45] Dua, R., Zia, H., Needham, T., The influence of tonicity and viscosity on the intranasal absorption of salmon calcitonin in rabbits, *Int. J. Pharm.* (1997) 147; 233-242
- [46] Ohwaki, T., Ando, H., Watanabe, S., Miyake, Y., Effects of dose, pH and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats, *J. Pharm. Sci.* (1985) 74; 550-552
- [47] Schoenwald, R.D., Ward, R.L., Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol-water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* (1978) 67; 786-788
- [48] Corbo, D.C., Liu, J.-C., Chien, Y.W., Characterization of the barrier properties of mucosal membranes, *J. Pharm. Sci.* (1990) 79; 202-206

-
- [49] Merck-Index, Merck & Co Inc., Whitehouse Station, 1996
- [50] Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg/ Berlin/ Oxford, 1996, pp. 596-598
- [51] Wolf, E., Adam hat PADAM, Pharmazeutische Zeitung (2000) 145; 11-17
- [52] Tukker, J.J., Ussing chamber to study active transport, Kurz-Vortrag, 3rd International intensive course and workshop on cell culture and other alternative methods for drug delivery research, Feb./März 2000, Saarbrücken
- [53] Hosoya, K.-I., Kubo, H., Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Yamashita, S., The structural barrier of absorptive mucosae: site difference of the permeability of fluorescein isothiocyanate-labelled dextran in rabbits, Biopharm. Drug Dispo. (1993) 14; 685-696
- [54] Miyamoto, M., Natsume, H., Iwata, S., Ohtake, K., Yamaguchi, M., Kobayashi, D., Sugibayashi, K., Yamashina, M., Morimoto, Y., Improved nasal absorption of drugs using poly-L-arginine: effects of concentration and molecular weight of poly-L-arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats, Eur. J. Phar. Biopharm. (2001) 52; 21-30
- [55] Cremophor® EL, Technisches Merkblatt, BASF, 1987
- [56] Brewster, M.E., Anderson, W.R., Loftsson, T., Huang, M.-J., Bodor, N., Pop, E., Preparation, characterization and anesthetic properties of 2-hydroxypropyl- α -cyclodextrin complexes of pregnanolone and pregnenolone in rat and mouse, J. Pharm. Sci. (1995) 84; 1154-1159
- [57] Rajewski, R.A., Stella, V.J., Pharmaceutical application of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, J. Pharm. Sci. (1996) 85; 1142-1169
- [58] Merkus, F.W.H.M., Verhoef, J.C., Marttin, E., Romeijn, S.G., van der Kuy, P.H.M., Hermens, W.A.J.J., Schipper, N.G.M., Cyclodextrins in nasal drug delivery, Adv. Drug Del. (1999) 36; 41-57
- [59] Irie, T., Uekama, K., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, J. Pharm. Sci. (1997) 86; 147-162

-
- [60] Loftsson, T., Brewster, M.E., Pharmaceutical application of cyclodextrins: 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.* (1996) 85; 1017-1025
- [61] Aktas, Y., Unlu, N., Orhan, M., Irkeç, M., Hincal, A.A., Influence of hydroxypropyl beta-cyclodextrin on the corneal permeation of pilocarpine, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2003) 29; 223-230
- [62] Vollmer, U., Müller, B.W., Peeters, J., Mesens, J., Wilffert, B., Peters, T., A study of the percutaneous absorption-enhancing effects of cyclodextrin derivatives in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* (1994) 46; 19-22
- [63] Shaker, D.S., Ghanem, A.-H., Li, S.K., Warner, K.S., Hashem, F.M., Higuchi, W.I., Mechanistic studies of the effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on in vitro transdermal permeation of corticosterone through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.* (2003) 253; 1-11
- [64] Constantinides, P.P., Scalart, J.-P., Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides, *Int. J. Pharm.* (1997) 158; 57-68
- [65] Keipert, S., Siebenbrodt, I., Lüders, F., Bornschein, M., Mikroemulsionen und ihre potentielle pharmazeutische Nutzung, *Pharmazie* (1989) 44; 433-444
- [66] Müller, B.W., Topische Mikroemulsionen als neue Wirkstoff-Trägersysteme, in: Müller, R.H., Hildebrand, G.E., (Hrsg.), *Pharmazeutische Technologie—Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1998; pp. 109-116
- [67] Zimmer, A., Attwood, D., Mikroemulsionen in: Herzfeldt, C.-D., Kreuter, J. (Hrsg.), *Grundlagen der Arzneiformenlehre – Galenik 2*, Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg, 1999; pp. 190-203
- [68] Gasco, M.R., Gallarate M., Trotta M., Bauchiero L., Gremmo E., Chiappero O., Microemulsions as topical delivery vehicles: ocular administration of timolol, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (1989) 7; 433-439
- [69] Bauchiero, L., Gremmo, E., Chiappero, O., Gasco, M.R., Gallarate, M., Trotta, M., Microemulsions as ophthalmic vehicles: studies on the release of timoptol, *New Trends Ophthalmol.* (1987) II; 377-379

-
- [70] Radomska, A., Dobrucki, R., The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters, *Int. J. Pharm.* (2000) *196*; 131-134
- [71] Vandamme, Th. F., Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and futur challenges, *Prog. Retin. Eye Res.* (2002) *21*; 15-34
- [72] Li, L., Nandi, I., Kim, K.H., Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam, *Int. J. Pharm.* (2002) *237*; 77-85
- [73] Haße, A., Entwicklung, Charakterisierung und Strukturuntersuchungen von tensidhaltigen Mehrkomponentensystemen zur okularen Anwendung, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 1996
- [74] Berndt, S., Entwicklung und Charakterisierung galenischer Formulierungen zur potentiellen nasalen Anwendung von Androstendion und Levodopa, Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin, 2000
- [75] Dalmora, M.E.A., Oliveira, A.G., Inclusion complex of piroxicam with α -cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion, *Int. J. Pharm.* (1999) *184*; 157-164
- [76] Dalmora, M.E., Dalmora, S.L., Oliveira, A.G., Inclusion complex of piroxicam with α -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect, *Int. J. Pharm.* (2001) *222*; 45-55
- [77] Maldonado, M.B., Lawrence, M.J., The incorporation of salicylic acid-dimethyl- α -cyclodextrin complex into water-in-oil microemulsions, *J. Pharm. Pharmacol.* (1998) *50*, Suppl.; 177
- [78] Singh, A.K., Kasinath, B.S., Lewis, E.J., Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* (1992) *1120*; 337-342
- [79] McEwan, G.T.A., Jepson, M.A., Hirst, B.H., Simmons, N.L., Polycation-induced enhancement of epithelial paracellular permeability is independent of tight junctional characteristics, *Biochim. Biophys. Acta* (1993) *1148*; 51-60
- [80] Benita, S., Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion, *Biomed. Pharmacother.* (1999) *53*; 193-206

-
- [81] Klang, S., Abdulrazik, M., Benita, S., Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution, *Pharm. Dev. Technol.* (2000) 5; 521-32
- [82] Müller, B.W., Kleinebudde, P., Untersuchungen an sogenannten Mikroemulsions-systemen, *Pharm. Ind.* (1988) 50; 370-375
- [83] Trotta, M., Gasco, M.R., Pattarino, F., Effect of alcohol cosurfactants on the diffusion coefficients of microemulsions by light scattering, *J. Disp. Sci. Tech.* (1989) 10; 15-32
- [84] Caputo, F.E., Burghardt, W.R., Krishnan, K., Bates, F.S., Lodge, T.P., Time-resolved small-angle x-ray scattering measurements of a polymer bicontinuous microemulsion structure factor under shear, *Phys. Rev.* (2002) 66; 1-17
- [85] Müller, B.W., Müller, R.H., Particle size distributions and particle size alterations in microemulsions, *J. Pharm. Sci.* (1984) 73; 919-922
- [86] Keipert, S., Schulz, G., Mikroemulsionen auf Saccharoseesterbasis, *Pharmazie* (1994) 49; 195-197
- [87] Moreno, M.A., Frutos, P., Ballesteros, M.P., Lyophilized lecithin based oil-water microemulsions as a new and low toxic delivery system for amphotericin B, *Pharm. Res.* (2001) 18; 344-351
- [88] Paul, B.K., Moulik, S.P., Microemulsions: an overview, *J. Disp. Sci. Tech.* (1997) 18; 301-367
- [89] Kielhorn, E., Bestimmung von Mischungswärmen tensidhaltiger Mehrkomponenten-systeme mittels der Dynamischen Differenz-Kalorimetrie, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 1997
- [90] Alami, E., Abrahmsen-Alami, S., Eastoe, J., Grillo, I., Heenan, R.K., Interactions between a nonionic surfactant and cyclodextrins investigated by small-angle neutron scattering, *J. Colloid. Interface Sci.* (2002) 255; 403-409
- [91] Leuenberger, H. (Hrsg.), Martin, Physikalische Pharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2002
- [92] Rosano, H.L., Lyons, G.B., Free energy, enthalpy and entropy changes during the formation of a n-hexadecane/ potassium stearate/ water/ 1-pentanol microemulsion system, *J. Chem. Phys.* (1985) 89; 363-365

-
- [93] Kaler, E.W., Bennett, K.E., Davis, H.T., Scriven, L.E., Toward understanding microemulsion microstructure: a small-angle X-ray scattering study, *J. Chem. Phys.* (1983) 79; 5673
- [94] Teubner, M., Strey, R., Origin of the scattering peak in microemulsions, *J. Chem. Phys.* (1987) 87; 3195-3200
- [95] Würz, U., Small angle X-ray scattering of microemulsions, *Progr. Colloid. Polym. Sci.* (1988) 76; 153-158
- [96] Ezrahi, S., Wachtel, E., Aserin, A., Garti, N., Structural polymorphism in a four-component nonionic microemulsion, *J. Colloid. Inter. Sci.* (1997) 191; 277-290
- [97] Seto, H., Okuhara, D., Kawabata, Y., Takeda, T., Nagao, M., Suzuki, J., Kamikubo, H., Amemiya, Y., Pressure and temperature effects on the phase transition from a dense droplet to a lamellar structure in a ternary microemulsion, *J. Chem. Phys.* (2000) 112; 10608-10614
- [98] Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T.M., Urtti, A., Microemulsions for topical delivery of estradiol, *Int. J. Pharm.* (2003) 254; 99-107
- [99] Sullivan, D.A., Sullivan, B.D., Ullman, M.D., Rocha, E.M., Krenzer, K.L., Cermak, J.M., Toda, I., Doane, M.G., Evans, J.E., Wickham, L.A., Androgen influence on the meibomian gland, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2000) 41; 3732-3742
- [100] Szejtli, J., Davies, J.E.D., Cyclodextrin technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 1988
- [101] Keipert, S., Fedder, J., Böhm, A., Hanke, B., Interactions between cyclodextrins and pilocarpin – as an example of a hydrophilic drug, *Int. J. Pharm.* (1996) 46; 355-360
- [102] Higuchi, T., Connors, K.A., *Advances in analytical chemistry and instrumentation*, New York Interscience, New York, 1965, pp. 128-131
- [103] Albers, E., Müller, B.W., Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.* (1992) 81; 756-761
- [104] Andersen, F.M., Bundgaard, H., The influence of β -cyclodextrin on the stability of hydrocortison in aqueous solution, *Arch. Pharm. Chem.* (1983) 11; 61-66

-
- [105] Masson, M., Loftsson, T., Masson, G., Stefansson, E., Cyclodextrins as permeation enhancers, *J. Control. Rel.* (1999) 59; 107-118
- [106] Bary, A.R., Tucker, I.G., Davies, N.M., Considerations in the use of hydroxypropyl- α -cyclodextrin in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortison, *Eur. J. Phar. Biopharm.* (2000) 50; 237-244
- [107] Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., Application of cyclodextrins, in: deBoer, A.G. (Ed.), *Drug Absorption Enhancement*, Harwood Academic Publisher, Chur, 1994, pp. 411-456
- [108] Grass, G.M., Robinson, J.R., Relationship of chemical structure to corneal penetration and influence of low-viscosity solution on ocular bioavailability, *J. Pharm. Sci.* (1984) 73; 1021-1027
- [109] Sasaki, H., Ichikawa, M., Yamamura, K., Nishida, K., Nakamura, J., Ocular membrane permeability of hydrophilic drugs for ocular peptide delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* (1997) 49; 135-139
- [110] Chang, S.-C., Lee, V.H.L., Nasal and conjunctival contributions to the systemic absorption of topical timolol in the pigmented rabbit: implications in the design of strategies to maximize the ratio of ocular to systemic absorption, *J. Ocul. Pharm.* (1987) 3; 159-169
- [111] Camber, O., An in vitro model for determination of drug permeability through the cornea, *Acta Pharm. Suec.* (1985) 22; 335-342
- [112] Camber, O., Edman, P., Influence of some preservatives on the corneal permeability of pilocarpine and dexamethasone, in vitro, *Int. J. Pharm.* (1987) 39; 229-234
- [113] Dittgen, M., Oestereich, S., Eckhardt, D., Influence of bioadhesion on the elimination of drugs from the eye and on their penetration ability across the pig cornea, *S.T.P. Pharma Sciences* (1992) 2; 93-97
- [114] Babiole, M., Wilhelm, F., Schoch, C., In vitro corneal permeation of unoprostone isopropyl (UI) and its metabolism in the isolated pig eye, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2001) 17; 159-172

-
- [115] Scholz, M., Lin, J.E., Lee, V.H., Keipert, S., Pilocarpine permeability across ocular tissues and cell cultures: influence of formulation parameters, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (2002) **18**; 455-468
- [116] Lang, S.R., Staudenmann, W., James, P., Manz, H.-J., Kessler, R., Galli, B., Moser, H.-P., Rummelt, A., Merkle, H.P., Proteolysis of human calcitonin in excised bovine nasal mucosa: Elucidation of the metabolic pathway by liquid secondary ionization mass spectrometry (LSIMS) and matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI), *Pharm. Res.* (1996) **13**; 1679-1685
- [117] Schmidt, M.C., Peter, H., Lang, S.R., Ditzinger, G., Merkle, H.P., In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism, *Adv. Drug Del. Rev.* (1998) **29**; 51-79
- [118] Schmidt, M.C., Simmen, D., Hilbe, M., Boderke, P., Ditzinger, G., Sandow, J., Lang, S., Rubas, W., Merkle, H.P., Validation of excised bovine nasal mucosa as in vitro model to study drug transport and metabolic pathways in nasal epithelium, *J. Pharm. Sci.* (2000) **89**; 396-407
- [119] Schmidt, M.C., Rubas, W., Merkle, H.P., Nasal epithelial permeation of thymotrinan (TP3) versus thymocartin (TP4): competitive metabolism and self-enhancement, *Pharm. Res.* (2000) **17**; 222-228
- [120] Östh, K., Grasjö, J., Björk, E., A new method for drug transport studies on pig nasal mucosa using a horizontal ussing chamber, *J. Pharm. Sci.* (2002) **91**; 1256-1273
- [121] Östh, K., Paulsson, M., Björk, E., Edsman, K., Evaluation of drug release from gels on pig nasal mucosa in a horizontal Ussing chamber, *J. Control. Rel.* (2002) **83**; 377
- [122] Wadell, C., Björk, E., Camber, O., Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2003) **18**; 47-53
- [123] Benson, H., Permeability of the cornea to topically applied drugs, *Arch. Ophthalmol.* (1974) **91**; 313-327
- [124] Hull, D.S., Hine, J.E., Edelhauser, H.F., Hyndiuk, R.A., Permeability of the isolated rabbit cornea to corticosteroids, *Invest. Ophthalmol.* (1974) **13**; 457-459

-
- [125] Saettone, M.F., Chetoni, P., Cerbai, R., Mazzanti, G., Braghiroli, L., Evaluation of ocular permeation enhancers: in vitro effects on corneal transport of four α -blockers, and in vitro/in vivo toxic activity, *Int. J. Pharm.* (1996) 142; 103-113
- [126] Frederiksen, O., Röpke, M., Hansen, M., Carstens, S., Holm, M., Christensen, P., Colding-Jorgensen, M., Danielsen, G., Phospholipid-induced changes in ion transport pathways of the rabbit nasal mucosa in vitro, *European Symposium APGI/FIP*, Paris, 1993
- [127] Bechgaard, E., Gizurason, S., Jørgensen, L., Larsen, R., The viability of isolated rabbit nasal mucosa in the Ussing chamber, and permeability of insulin across the membrane, *Int. J. Pharm.* (1992) 87; 125-132
- [128] Siefert, B., Keipert, S., Influence of α -cyclodextrin and hydroxyalkylated α -cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions, *J. Pharm. Sci.* (1997) 86, 716-720
- [129] Ammar, H.O., El-Nahhas, S.A., Khalil, R.M., Cyclodextrins in acetazolamide eye drop formulations, *Pharmazie* (1998) 53; 559-562
- [130] Rajewski, R.A., Stella, V.J., Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, *J. Pharm. Sci.* (1996) 85; 1142-1169
- [131] Hosoya, K.-I., Kubo, H., Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique, *Biol. Pharm. Bull.* (1994) 17; 316-322
- [132] Shao, Z., Krishnamoorthy, R., Mitra, A.K., Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: mechanistic evaluations, *Pharm. Res.* (1992) 9; 1157-1163
- [133] Marttin, E., Verhoef, J.C., Romeijn, S.G., Merkus, F.W.H.M., Effects of absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo: release of marker compounds in the nasal cavity, *Pharm. Res.* (1995) 12; 1151-1157
- [134] Marttin, E., Verhoef, J.C., Romeijn, S.G., Zwart, P., Merkus, F.W.H.M., Acute histopathological effects of benzalkonium chloride and absorption enhancers on rat nasal epithelium in vivo, *Int. J. Pharm.* (1996) 141; 151-160

-
- [135] Kristinsson, J.K., Fridriksdottir, H., Thorisdottir, S., Sigurdardottir, A.M., Stefansson, E., Loftsson, T., Dexamethasone-cyclodextrin-polymer co-complexes in aqueous eye drops, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1996) 37; 1199-1203
- [136] Hochman, J., Artursson, P., Mechanism of absorption enhancement and tight junction regulation, *J. Control. Rel.* (1994) 29; 256-267
- [137] Leszczynski, D.E., Schafer, R.M., Characterization of steroid hormone association with human plasma lipoproteins, *Steroids* (1989) 54; 37-53
- [138] Prausnitz, M.R., Noonan, J.S., Permeability of cornea, sclera and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye, *J. Pharm. Sci.* (1998) 87; 1479-1488
- [139] Brittebo, E.B., Rafter, J.J., Steroid metabolism by rat nasal mucosa: studies on progesterone and testosterone, *J. Steroid. Biochem.* (1984) 20; 1147-1151
- [140] Southren, A.L., Altman, K., Vittek, J., Boniuk, V., Gordon, G.G., Steroid metabolism in ocular tissues of the rabbit, *Invest. Ophthalmol.* (1976) 15; 222-228
- [141] Starka, L., Obenberger, J., Testosterone metabolism in various tissues of the intact and inflamed rabbit eye, *Ophthal. Res.* (1976) 8; 374-378
- [142] Ploc, I., Sulcova, J., Starka, L., Androgen metabolism in the epithelium of the bovine cornea, *Endokrinol.* (1978) 72; 237-333
- [143] Donovan, M.D., Flynn, G.L., Amidon, G.L., Absorption of polyethylene glycols 600 through 2000: The molecular weight dependence of gastrointestinal and nasal absorption, *Pharm. Res.* (1990) 7; 863-868
- [144] Hirai, S., Yashiki, T., Matsuzawa, T., Mima, H., Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat, *Int. J. Pharm.* (1981) 7; 317-325
- [145] Grass, G.M., Wood, R.W., Robinson, J.R., Effects of calcium chelating agents on corneal permeability, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1985) 26; 110-113
- [146] Grass, G.M., Robinson, J.R., Mechanisms of corneal drug penetration II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement, *J. Pharm. Sci.* (1988) 77; 15-23
- [147] Schoenwald, R.D., Huang, H.-S., Corneal penetration behaviour of α -blocking agents I: Physicochemical factors, *J. Pharm. Sci.* (1983) 72; 1266-1271

-
- [148] Hornof, M.D., Bernkop-Schnürch, A., In vitro evaluation of the permeation enhancing effect of polycarbophil-cystein conjugates on the cornea of rabbits, *J. Pharm. Sci.* (2002) *91*; 2588-2592
- [149] Nishijo, J., Tsuchitani, M., Interaction of L-tryptophan with α -cyclodextrin: studies with calorimetry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* (2001) *90*; 134-140
- [150] Marttin, E., Verhoef, J.C., Spies, F., van der Meulen, J., Nagelkerke, J.F., Koerten, H.K., Merkus, F.W.H.M., The effect of methylated α -cyclodextrins on the tight junctions of the rat nasal respiratory epithelium: electron microscopic and confocal laser scanning microscopic visualization studies, *J. Pharm. Sci.* (1999) *57*; 205-213
- [151] Gaskonda, V.R., Khan, M.A., Hutak, C.M., Reddy, I.K., Permeability characteristics of novel mydriatic agents using an in vitro cell culture model that utilizes sirc rabbit corneal cells, *J. Pharm. Sci.* (1999) *88*; 180-184
- [152] Bach, M., Lippold, B.C., Percutaneous penetration enhancement and its quantification, *Eur. J. Phar. Biopharm.* (1998) *46*; 1-13
- [153] Hussain, A.A., Intranasal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* (1998) *29*; 39-49
- [154] Stratford jr., R.E. and Lee, V.H.L., Aminopeptidase activity in homogenates of various absorptive mucosae in the albino rabbit: implications in peptide delivery, *Int. J. Pharm.* (1986) *30*; 73-82
- [155] Koolman, J., Röhm, K.-H., Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York, 1994
- [156] Ko, K.-T., Needham, T.E., Zia, H., Emulsion formulations of testosterone for nasal administration, *J. Microencapsulation* (1998) *15*; 197-205
- [157] Shackleton, C.H.L., Whitney, J.O., Use of Sep-pak[®] cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis, *Clin. Chim. Acta* (1980) *107*; 231-243
- [158] Andersson, S.H.G., Cronholm, T., Sjövall, J., Effects of ethanol on the levels of unconjugated and conjugated androgens and estrogens in plasma of men, *J. Steroid. Biochem.* (1986) *24*; 1193-1198

-
- [159] Stuenkel, C.A., Dudley, R.E., Yen, S.S.C., Sublingual administration of testosterone-hydroxypropyl- α -cyclodextrin inclusion complex simulates episodic androgen release in hypogonadal men, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* (1991) 72; 1054-1059
- [160] Hussain, A.A., Kimura, R., Huang, C.H., Nasal absorption of testosterone in rats, *J. Pharm. Sci.* (1984) 73; 1300-1301
- [161] Bron, A.J., Tiffany, J.M., The meibomian glands and tear film lipids, *Adv. Exp. Med. Biol.* (1998) 438; 281-295
- [162] Kaercher, T., Möbius, D., Jaeger, W., Schichtdickenbestimmung des Sekrets Meibomscher Drüsen unter in vitro-Bedingungen, *Fortschr. Ophthalmol.* (1986) 83; 90-94
- [163] Hart, W.M. (Ed.), *Adler's Physiology of the Eye*, Mosby Year Book, Inc., St. Louis, 1992
- [164] Shimazaki, J., Sakata, M., Tsubota, K., Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction, *Arch. Ophthalmol.* (1995) 113; 1266-1270
- [165] Krenzer, K.L., Dana, M.R., Ullman, M.D., Cermak, J.M., Tolls, D.B., Evans, J.E., Sullivan, D.A., Effect of Androgen Deficiency on the Human Meibomian Gland and Ocular Surface, *J. Clin. Endocrin. Metabol.* (2000) 85; 4874-4882
- [166] Tiffany, J.M., Marsden, R.G., The influence of composition on physical properties of meibomian secretion. In: Holly, F.J., (Ed.), *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, TX: Dry Eye Institute, 1986, pp. 597-608
- [167] McCulley, J.P., Shine, W., A compositional based model for the tear film lipid layer, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* (1997) 95; 79-88
- [168] McCulley, J.P., Shine, W.E., The lipid layer: the outer surface of the ocular surface tear film, *Biosci. Rep.* (2001) 21; 407-418
- [169] Kawaguchi, S., Studies on the precorneal film with measurement of monomolecular surface pressure, *Fol. Ophthalmol. Jpn.* (1967) 18; 283-289
- [170] Jaeger, W., Möbius, D., Kaercher, T., In: Holly, F.J., (Ed.), *The Preocular Tear Film in Health, Disease and Contact Lens Wear*. Lubbock, TX: Dry Eye Institute, 1986, pp. 609-621

-
- [171] Jaeger, W., Möbius, D., Kaercher, T., Biophysikalische experimentelle Untersuchungen über die Stabilität und Flexibilität der Lipidschicht des Tränenfilms unter Bedingungen der Kompression und Spreitung, *Fortschr. Ophthalmol.* (1986) 83; 86-89
- [172] Kaercher, T., Möbius, D., Stabilität und Flexibilität der Lipidschicht des Tränenfilms sowie deren pathologischer Veränderungen im biophysikalischen Experiment, *Fortschr. Ophthalmol.* (1989) 86; 245-248
- [173] Kaercher, T., Möbius, D., Welt, R., Biophysical characteristics of the Meibomian lipid layer under in vitro conditions, *Int. Ophthalmol.* (1992) 16; 167-176
- [174] Kaercher, T., Möbius, D., Welt, R., Biophysical behaviour of the infant Meibomian lipid layer, *Int. Ophthalmol.* (1994) 18; 15-19
- [175] Kaercher, T., Hönig, D., Möbius, D., Brewster angle microscopy, A new method of visualizing the spreading of Meibomian lipids, *Int. Ophthalmol.* (1993) 17; 341-348
- [176] Kaercher, T., Hönig, D., Möbius, D., Meibomian lipid layers seen through BAM, *Orbit* (1995) 14; 17-24
- [177] Kaercher, T., Hönig, D., Möbius, D., Welt, R., Morphologie des Meibom-Lipidfilms, *Ophthalmologie* (1995) 92; 12-16
- [178] Kim, J., Levitsky, I.A., McQuade, D.T., Swager, T.M., Structural control in thin layers of poly(p-phenyleneethynylene)s: photophysical studies of Langmuir and Langmuir-Blodgett films, *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124; 7710-7718
- [179] Glasgow, B.J., Marshall, G., Gasymov, O.K., Abduragimov, A.R., Yusifov, T.N., Knobler, C.M., Tear lipocalins: potential lipid scavengers for the corneal surface, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1999) 40; 3100-3107
- [180] Vollhardt, D., Fainermann, V.B., Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers, *Adv. Colloid. Interface Sci.* (2000) 86; 103-151
- [181] Stella, V.J., Rajewski, R.A., Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery, *Pharm. Res.* (1997) 14; 556-567

-
- [182] Müller, B.W., Brauns, U., Hydroxypropyl- α -cyclodextrin derivatives: influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity, *J. Pharm. Sci.* (1986) 75; 571-572
- [183] Zia, V., Rajewski, R.A., Bornancini, E.R., Luna, E.A., Stella, V.J., Effect of alkyl chain length and degree of substitution on the complexation of sulfoalkyl ether α -cyclodextrins with steroids, *J. Pharm. Sci.* (1997) 86; 220-224
- [184] DeGrip, W.J., VanOostrum, J., Bovee-Geurts, P.H.M., Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel approach for the preparation of proteoliposomes, *Biochem. J.* (1998) 330; 667-674
- [185] Topchieva, I.I., Karezin, K., Self-assembled supramolecular micellar structures based on non-ionic surfactants and cyclodextrins, *J. Colloid. Interface Sci.* (1999) 213; 29-35
- [186] Jabbal Gill, I., Fisher, A.N., Hinchcliffe, M., Whetstone, J., Farraj, N., DePonti, R., Illum, L., Cyclodextrins as protection agents against enhancer damage in nasal delivery systems II. Effect on in vivo absorption of insulin and histopathology of nasal membrane, *Eur. J. Pharm. Sci.* (1994) 1; 237-248
- [187] Goto, E., Shimazaki, J., Monden, Y., Takano, Y., Yagi, Y., Shimmura, S., Tsubota, K., Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction, *Ophthalmology* (2002) 109; 2030-2035
- [188] Francoeur, M., Ahmed, I., Sitek, S., Patton, T.F., Age-related differences in ophthalmic drug disposition III. Corneal permeability of pilocarpin in rabbits, *Int. J. Pharm.* (1983) 16; 203-213
- [189] Boltri, L., Morel, S., Trotta, M., Gasco, M.R., In vitro transdermal permeation of nifedipin from thickened microemulsions, *J. Pharm. Belg.* (1994) 49; 315-320
- [190] Bhatnagar, S., Vyas, S.P., Organogel-based system for transdermal delivery of propranolol, *J. Microencapsulation* (1994) 11; 431-438
- [191] Schmalfuß, U., Neubert, R., Wohlrab, W., Modification of drug penetration into human skin using microemulsions, *J. Controlled Rel.* (1997) 46; 279-285

- [192] Scholz, M., In vitro Permeationsstudien von hydrophilen und lipophilen Arzneistoffen an okularen Geweben und Zellkulturen, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2003